

**Methodenkritische Untersuchungen zur
Fibrinolyseautographie nach A.S.Todd**

Peter Lepiorz

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553801_0031

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. J. Zander

METHODENKRITISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FIBRINOLYSEAUTOGRAFIE
NACH A.S. TODD

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
P e t e r L e p i o r z

München 1970



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. H. Ludwig
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. J. Zander
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.1.1971



INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG

1. Gewebeaktivatoren des Plasminogens 7
2. Physiologische Bedeutung der Gewebeaktivatoren 11
3. Bedeutung der lokalen Fibrinolyse für die Pathophysiologie 12
4. Nachweismethoden der Gewebeaktivatoren 14

B. METHODIK

1. Fibrinolyseautographie nach Todd 16
2. Eigene, modifizierte Methodik der Fibrinolyseautographie . 17
3. Zusammenstellung der verwendeten Geräte und Substanzen . . 21

C. ERGEBNISSE DER EIGENEN METHODE

1. Entstehung von Lysezonen bei der Fibrinolyseautographie . 23
2. Verteilung fibrinolytischer Aktivität im Uterusgewebe . . 27

D. DISKUSSION

1. Die Fibrinolyseautographie als histochemische Methode . . 39
2. Abhängigkeiten der Fibrinolyse 43

E. ZUSAMMENFASSUNG 50

F. LITERATURVERZEICHNIS 52

A. EINLEITUNG

1. Gewebeaktivatoren des Plasminogens

Unter Fibrinolyse versteht man die enzymatische Verflüssigung von Blut- oder Fibringerinnsel (28).

Das fibrinolytische System ist analog dem Gerinnungssystem aufgebaut. Zwischen beiden besteht ein dynamisches Gleichgewicht. Gemeinsamer Angriffspunkt ist das Fibrinogen - Fibrin (Abb. 1).

Das aktive fibrinolytische Enzym, das Plasmin, entsteht aus einer inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen, das in der Euglobulinfraktion des Blutplasmas vorkommt (28, 86, 89). Seine Aktivierung, in Form von Abspaltung eines lipoidhaltigen Hemmkörpers (9, 17), geschieht durch das Proaktivator - Aktivator - System des Blutes, oder durch gewebeständige Aktivatoren (8, 11, 12, 90). Ist einmal aktives Plasmin vorhanden, so kann es autokatalytisch die weitere Umwandlung des restlichen Plasminogens bewirken. Als spezifisch proteolytisches Enzym spaltet es Fibrin (MG 330 000) in lösliche Fibrin-Polypeptide (MG 100 000) (86).

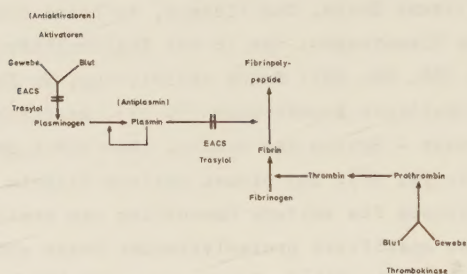
Lambert und Hanes (1911) beobachteten zum ersten Mal den fibrinolytischen Effekt von Gewebe (48), der von Fleischer und Loeb (29) in weiteren Versuchen bestätigt wurde. Demuth und von Riesen (1928) vermuteten, dass durch Gewebe ein proteolytisches Proenzym im Plasma aktiviert wird (24). Erst 1948 gelang es Astrup und Permin (8), das Vorhandensein eines Plasminogenaktivators in verschiedenen menschlichen und tierischen Geweben zu zeigen.

Nach Tagnon und Palade (1950) (88), sowie Lewis und Ferguson (50), liegen die zellulären Aktivatoren in aktiver Form in den Zellmikrosomen. Neuere Untersuchungen durch Ali und Lack (1965) ergaben, dass die Fibrinolyseaktivatoren auch innerhalb einer Lipoproteidhülle intrazellulär nachweisbar sind. Man beobachtete die höchste Aktivität in der Lysosomen-Fraktion (6, 57, 87).

Die zellulären Aktivatoren sind in Körperflüssigkeiten unlöslich (9); die von ihnen ausgelöste Fibrinolyse wirkt sich daher eher lokal aus.

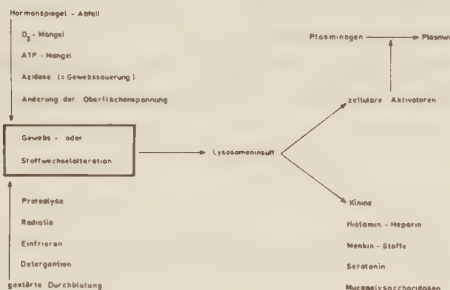
Die Freisetzung von zellulären Aktivatoren aus den Lysosomen wird im einzelnen unter folgenden Bedingungen stimuliert: Änderung des pH (Azidose), Änderung der Oberflächenspannung und der Zellpermeabilität,

Abb. 1 Schema des dynamischen Gleichgewichts zwischen Gerinnungssystem und Fibrinolyse-
system



Änderung des Zellstoffwechsels, ATP-Mangel, Sauerstoffmangel, exogener Einfluss proteolytischer Enzyme (Mitochondrien-Schädigung), Autolyse, gestörte Durchblutung, Hormonspiegelabfall (9, 17, 30, 57, 81, 86) (Abb. 2).

Abb. 2 Schema zur Freisetzung zellulärer Aktivatoren



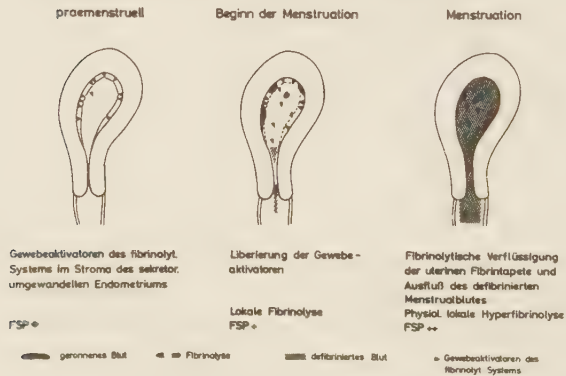
Um die Darstellung der gewebsgebundenen fibrinolytisch aktiven Stoffe haben sich vor allem Albrechtsen (3 - 5) und Astrup (8 - 17) verdient gemacht. In vergleichenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Uterus unter allen Organen mit Abstand die höchste Konzentration an fibrinolytisch aktiven Substanzen aufweist.

Die weiteren Ausführungen sind deshalb auf die Bedeutung der Gewebeaktivatoren des Uterus beschränkt.

Abb. 3 Zusammenhang zwischen zyklischer uteriner Blutung und lokalem fibrinolytischem Potential

- a) praemenstruell: Gehalt an Gewebeaktivatoren der Fibrinolyse nimmt in Nachbarschaft der Stromagefäße des sekretorisch umgewandelten Endometriums zu.
- b) Beginn der Menstruation: Durch Permeabilitätsstörungen an der Endstrombahn kommt es zum Abbruch der Funktionalis, wobei sich lakunäre Blutungen in das Cavum uteri ergießen und austretendes Plasma nach Kontakt mit zerfallendem Gewebe gerinnt. Gleichzeitig findet aber durch Gewebszerfall Liberierung der Gewebeaktivatoren statt.
- c) Menstruation: Entstandene extravasale Fibrinierungen bleiben nicht stabil. Das durch Gewebeaktivatoren aktivierte Plasmin, dessen inaktive Vorstufe Plasminogen mit dem ausgetretenen Blut ins Cavum uteri gelangt, verflüssigt die uterine Fibrintapete und lässt durch lokale Hyperfibrinolyse defibriniertes Menstrualblut abfließen, in dem Fibrinospaltprodukte nachgewiesen werden können.

ZYKLISCHE UTERINE BLUTUNG UND LOKALES FIBRINOLYTISCHES POTENTIAL



2. Physiologische Bedeutung der Gewebeaktivatoren

Eine bedeutende Rolle spielen die Gewebeaktivatoren für den regelrechten Ablauf zyklischer Funktionsblutungen (Abb. 3). Im normalen Endometrium gelingt der Nachweis von Gewebeaktivatoren der Fibrinolyse (3, 8, 13, 33, 42, 71, 74, 78, 81, 91, 96). Dabei bestehen zyklusabhängige quantitative Unterschiede (3, 45, 57). So nimmt in der Sekretionsphase der Gehalt an Gewebeaktivator der Fibrinolyse in Nachbarschaft der Stromagefäße zu (42, 45, 71, 81, 93), was als Vorbereitung auf menstruelle Abräumvorgänge anzusehen ist (54). Diese spielen sich, durch die fibrinolytisch inaktive Basalis vom Myometrium getrennt, an der inneren Oberfläche des Uterus ab. Nach Ausbleiben der Konzeption kommt es durch Permeabilitätsstörungen an der Endstrombahn zum Abbruch der hochdifferenziert aufgebauten Funktionalis und somit zum Freiwerden der Gewebeaktivatoren. Das durch sie, mittels Abspaltung eines Hemmkörpers, aktivierte fibrinolytische Enzym (Plasmin), dessen inaktive Vorstufe mit dem ausgetretenen Blut in das Cavum uteri gelangt ist, liquefiziert die im Kontakt mit zerfallendem Gewebe entstandenen extravasalen Fibrinierungen (54, 85). Was als Menstrualblut durch den Zervikalkanal absickert, ist im physiologischen Falle defibriniertes Blut. Diese Ungerinnbarkeit ist als Phänomen einer lokalen uterinen Fibrinolyse anzusehen (2, 4, 19, 52a).

Wären die Endometrien fibrinolytisch inaktiv, hätte jede Fibrin-Anreicherung im Stroma - wie sie bei Permeabilitätssteigerung und Blutung zu erwarten ist - eine Fibrose des Endometriums, und somit völligen Funktionsverlust zur Folge. Die verstärkte Blutung ist eine unvermeidbare Begleiterscheinung. Sie kommt erst zum Stehen, wenn infolge Histiolyse - die durch Abbauprodukte der Fibrinolyse stimuliert - die ganze fibrinolytisch aktive Funktionalis eliminiert ist (81). Da die Basalis als inaktiv anzusehen ist (57, 81, 93), kommt es zu einer dauerhaften Hämostase.

Auch bei der Nidation des befruchteten Eies haben die Gewebeaktivatoren der Fibrinolyse Bedeutung (81). Zur Implantationszeit (mittlere Sekretionsphase) ist das Endometrium fibrinolytisch hoch aktiv. Die von der Blastozyste im angrenzenden Gewebe hervorgerufene pH-Verschie-

bung (20) bewirkt einen lokalen Reiz, der zu einer Permeabilitätssteigerung der Gefässe führt, und die zellulären Fibrinolyseaktivatoren mobilisiert. Daraus resultiert eine auf die Kontaktzone Blastozyste und Stroma beschränkte Aktivierung der Fibrinolyse und Proteolyse, die das endometriale Stroma alteriert, und mittels Abbauprodukte (6) die histiolytischen Reaktionen am Ort weiter unterhält. Der Trophoblast hat nur das alterierte Gewebe zu resorbieren, den entstandenen Raum durch eigenes Wachstum zu füllen.

Neben der Erhaltung durchgängiger Strombahnen (1, 36, 37, 43) wird der lokalen Fibrinolyse eine grosse Bedeutung für Entzündungsvorgänge und reparative Gewebsreaktionen beigemessen (1, 10, 13, 14, 17, 44, 45, 91). Es wird angenommen, dass die Fibrinolyse den Primärvorgang des Entzündungsgeschehens darstellt. Die Abbauprodukte des Fibrins und andere Eiweisskörper stimulieren eine exsudative, entzündliche Reaktion, die im Extremfall zur Histiolyse führt (81). Dagegen induziert das bei der Gewebsalteration im Gewebe auftretende Fibrin die Fibroblasten- und Angioblastensprossung. Die im Entzündungsbereich ablaufende Fibrinolyse löst das Fibrin auf und lässt Bindegewebe zurück.

In Geweben, die häufig von Blutungen betroffen sind, beeinflusst also die gewebsgebundene Fibrinolyse nicht nur die Hämostase, sondern ist zugleich entscheidend für den definitiven Gewebsbau (28, 44).

3. Bedeutung der lokalen Fibrinolyse für die Pathophysiologie

Bei ausgedehntem Zelluntergang werden in grossem Masse Gewebeaktivatoren frei. So wird postmortal immer eine starke Fibrinolyse beobachtet (28). Auch bei traumatischer Gewebsläsion, bei forcierter Röntgenbestrahlung und nach Verbrennungen kommt es zu einer gesteigerten Blutfibrinolyse (30, 86).

Vitale Vorgänge, die Lysen von der Stärke wie bei Aktivatorfreisetzung infolge Zelluntergang auslösen, sind Strukturänderungen der Oberfläche, wie sie bei anaphylaktischen und anaphylaktoiden Reaktionen vorkommen. So ist das generalisierte Shwartzman-Sanarelli-Phänomen von einer sehr starken Fibrinolyse gefolgt (79, 84).

Auch bei der Geburt kann es pathologischerweise zur Freisetzung zellulärer Aktivatoren kommen (28). Bei Verletzung des Uterus anlässlich artefiziellern Abort und manueller Placentalösung, bei intrauterinem Fruchttod, bei aktiver Geburtsleitung am wehenlosen Uterus und bei Operationen werden die in aktiver Form vorliegenden Gewebeaktivatoren in die Blutbahn eingeschwemmt (55). Dies führt, durch Lyse frischer Fibrinthromben, zu Blutungen, im ungünstigsten Fall - durch völlige Auflösung des Fibrinogens - sogar zu tödlichen Afibrinogenaemieblutungen. So ist die Annahme berechtigt, dass, bei dem hohen Aktivatorgehalt des Uterus, die Mehrzahl der geburtshilflichen Blutungen durch lokale Hyperfibrinolyse zustande kommt (52a, 53, 55).

Die bei der Nidation angenommenen Vorgänge zeigen, dass die mangelhafte fibrinolytische Aktivität mancher Endometrien bei Ovarialinsuffizienz jede Implantation erschweren oder unmöglich machen können (3). Allerdings kann auch eine gesteigerte oder persistierende Aktivität störend sein: bei der verzögert einsetzenden Dezidualisation durch anhaltende Förderung der Histiolyse kommt es zur Placenta accreta (81).

Die Bedeutung der bei der zyklischen Funktionsblutung geschilderten generalisierten Endometriumautolyse und Abstossung wird deutlich bei pathologischen Endometrien, deren Stroma einen ungleichförmigen Strukturzustand aufweist (3, 71, 85). Bei dysfunktionellen Blutungen wird das Gewebe nur partiell alteriert, aktiviert und abgestossen. So können sich die lokalen Stimulatoren der Blutung und der Fibrinolyse weiter auswirken. Die Blutung persistiert.

In auffälliger Weise korrelieren mangelnder Aktivatorgehalt der Gefässintima mit thrombotischen und atherosklerotischen Gefässveränderungen (39).

Auch im Myometrium sind Gewebeaktivatoren der Fibrinolyse nachzuweisen (5, 17, 45, 55, 57, 74, 80, 91, 93, 96). Albrechtsen (5) fand im Myometrium eine mit dem Sekretionsphasen-Endometrium vergleichbare fibrinolytische Aktivität. Unverändert hoch ist auch die Aktivatorenanhäufung im Myometrium am Ende der Gravidität (55). Mit Zunahme der Muskelmasse des Uterus im Verlauf der Gravidität (99) und der absoluten Zunahme der intramuskulären Blutgefässe steigt der Gehalt des Fibrinolyseaktivators. Seine Aktivität wirkt sich bei brüsken Abrasionen, be-

stimmten Myombildungen (80) und bei der Myometritis (81) durch Blutungsanfälligkeit aus.

Schliesslich wird vermutet, dass die Gewebeaktivatoren der Fibrinolyse eine Bedeutung für Reifegrad und Invasionsart des Karzinoms haben (18, 69, 70, 81). Beim Kollum-Karzinom konnte beispielsweise eine Korrelation zwischen fibrinolytischer Aktivität und der Invasionsart des Karzinoms festgestellt werden. An der Peripherie von neoplasmatischem Gewebe finden sich netzförmige Fibrinablagerungen, entlang denen entartete Zellen wachsen können (69). Fehlende fibrinolytische Aktivität begünstigt möglicherweise das exophytische Wachstum (70, 81), während bei hohem Aktivatorgehalt dem Gewebe der Stimulus für eine produktive Reaktion entzogen wird, und das Karzinom endophytisch wächst (81). Die fibrinolytische Aktivität beeinflusst so vermutlich die definitive Gestalt der Karzinome (18, 70, 81, 97).

4. Nachweismethoden der Gewebeaktivatoren

Es gibt drei grundsätzliche Nachweismethoden:

a) im Drainageblut

Untersuchungen des Blutes .ex utero (19, 85) ergeben

- stark erhöhte fibrinolytische Aktivität, nachgewiesen auf Rinderfibrinplatten (Astrup und Müllertz) (79, 86),
- verminderten Plasminogengehalt, nachgewiesen mit Profibrinolysezeit (Witte und Dirnberger) (79, 86).

Bei vergleichenden Untersuchungen finden sich dagegen im peripheren Blut normale Plasminogenwerte und kein Nachweis fibrinolytischer Aktivität.

Menstrualblut koaguliert auch nicht nach Thrombinzusatz und nicht nach Zusatz von Thromboplastin oder Calcium, was auf Fehlen von Fibrinogen schliessen lässt.

Fibrin(ogen)spaltprodukte im Drainageblut in höherer Konzentration als im zirkulierenden Blut beweisen fibrinolytische Vorgänge im Cavum uteri, ausgelöst durch Aktivatoren des Plasminogens.

b) mit Gewebsextrakt

Albrechtsen und Astrup (1957) fanden heraus, dass die nicht waserlöslichen zellulären Fibrinolyseaktivatoren mit KSCN löslich gemacht und extrahiert werden können (13). Durch Ansäuern mit HCl ist es möglich, die Proteinaseinhibitoren zu entfernen. Der entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert und im ursprünglichen Volumen KSCN wieder aufgelöst. Die KSCN-Lösung enthält die gereinigten Gewebeaktivatoren der Fibrinolyse. Die Konzentration des Aktivators wird auf Standard-Fibrinplatten (Astrup und Müllertz) getestet.

Mit Hilfe eines Standardpräparates (1 mg = 1 E Gewebsfibrinolyso-kinase) lässt sich auf doppelt logarithmischem Papier eine Standardkurve herstellen, an der die lytische Aktivität anderer Präparate in E/pro g Gewebe getestet werden kann.

c) durch Fibrinolyseautographie (nach Todd) (95)

Sie stellt eine histochemische Methode zur Lokalisation von Gewebeaktivatoren der Fibrinolyse dar, modifiziert nach der Fibrinplattenmethode von Permin (73).

Ein gefrorener Schnitt eines nicht fixierten Gewebes wird mit einem dünnen, plasminogenhaltigen Fibrinfilmm bedeckt und inkubiert. Während der Inkubationszeit wird das überschichtete Fibrin an Stellen lysiert, an denen sich im Gewebe eine Ansammlung von Plasminogenaktivatoren findet. Gewebe und Fibrin werden zusammen fixiert und gefärbt. Fibrinolysezonen sind dann als blasse Flecken im sonst dunkel gefärbten Fibrin zu sehen. Sie können topographisch mit den Strukturen des darunter liegenden Schnittes in Bezug gebracht werden.

B. METHODIK

1. Fibrinolyseautographie nach Todd (1967)

Zu untersuchendes Gewebe wird in Plastikbeutel gegeben, die Michaelis-Veronal-Puffer (pH 7,4) (Macfarlane und Biggs, 1963) und ein Bakteriostatikum enthalten. Die Beutel werden in ein Trockeneis/Aceton-Gemisch gelegt und nach dem Einfrieren des Gewebes bei -30°C aufbewahrt.

a) Spezielle Geräte

Eine mit 3 Nivellierschrauben versehene Glasplatte in der Abmessung 60 x 45 x 0,6 cm.

Ein Kunststoffrahmen 14 x 20 x 0,2 cm gross mit einer in der Mitte gelegenen Öffnung von 6 x 16 cm.

Feuchte Kammern für die Inkubation.

Wasserwaage.

b) Fibrinogen-Lösung

Aus Armour's Bovine Plasma Fraction I wird mit Michaelis-Puffer und zugefügtem Bakteriostatikum eine 2%ige Lösung hergestellt.

c) Thrombin-Lösung

Topical Bovine Thrombin (Parke Davis) (Stammlösung 1000 E/ml in 50%igem Glycerol) wird mit Michaelis-Puffer auf 20 E/ml verdünnt.

d) Herstellung des Fibrinfilms

Die Oberfläche der Glasplatte wird mit den Nivellierschrauben und der Libelle waagrecht eingestellt. Der Kunststoffrahmen mit der rechteckigen Öffnung wird aufgelegt. Einige Tropfen Michaelis-Puffer zwischen Glasplatte und Kunststoffrahmen gewährleisten eine feste Haftung. Ein Bogen Cellophan - grösser als der Rahmen - wird mit Puffer angefeuchtet. Anschliessend wird der Bogen über den Kunststoffrahmen gelegt, in der zentralen Öffnung geglättet und somit in enge Verbindung mit der Glasoberfläche gebracht. In die so gebildete Vertiefung giesst man eine Koagulationsmischung aus 3,5 ml Fibrinogen-Lösung und 0,2 ml Thrombin-Lösung. Nach dem Festwerden schneidet man den so gebildeten Fibrinfilmm einschliesslich des Cellophans in Streifen.

e) Herstellung des Gewebeschnittes

Das Gewebestück wird mit einem Kryostatmikrotom in einer Stärke von 7 - 9 μ geschnitten.

f) Herstellung des Autographen

Der Schnitt wird auf einen Objektträger aufgebracht und mit dem in Streifen geschnittenen Fibrinfilmm samt Cellophan bedeckt. Dabei muss die Fibrinseite auf den Objektträger zu liegen kommen. Der mit Gewebeschnitt und Fibrinfilmm bedeckte Objektträger kommt nun in eine feuchte Kammer. Zur weiteren Behandlung wird er im Brutschrank bei +37°C für 30 - 60 Minuten inkubiert.

Die Empfindlichkeit des Autographen kann durch Veränderung der Inkubationszeit und -temperatur wesentlich verbessert werden. Die besten Ergebnisse erhält man, wenn das Präparat für 24 - 48 Stunden einer Temperatur von +4°C ausgesetzt, dann entweder in Formalin fixiert, oder zuvor noch im Brutschrank bei +37°C für 15 - 30 Minuten inkubiert wird.

Nach der Inkubation wird der Autograph für 5 Minuten in neutral gepuffertes Formalin gestellt, danach das Cellophan abgezogen. Fibrin und Schnitt verbleiben auf dem Objektträger und kommen für weitere 12 - 18 Stunden in Formalin. Anschliessend wird das Präparat 5 - 10 Minuten in Harris' Haematoxylin gefärbt, in Aqua destillata differenziert bis keine Farbe mehr abgeht, für 15 - 20 Sekunden in 3%igem ammoniakalischem Alkohol 70 % gebläut und in Alkohol 96 % dehydriert, in Xylol gesäubert und vorsichtig mit Cedax eingedeckt.

2. Eigene, modifizierte Methodik der Fibrinolyseautographie (Abweichungen und Ergänzungen)

Es kommt nur frisches Gewebe zur Verarbeitung, das unmittelbar nach der Entnahme in geeignete Stücke zurechtgeschnitten, und anschliessend sofort mit CO₂-Schnee eingefroren wird.

Zu 1 b) Fibrinogen-Lösung

Wir lösen 2 x 60 mg Fibrinogen vom Rind (Behring) in 6 ml

Michaelis-Puffer (pH 7,4), dem eine Spatelspitze Cialit als Bakteriostatikum beigelegt ist, und erhalten eine 2%ige Fibrinogen-Lösung.

Zum besseren Auflösen des Fibrinogens wird das abgedeckte Becherglas für 1 - 2 Stunden in den Brutschrank bei +37°C gestellt.

Zu 1 c) Thrombin-Lösung

Einem Fläschchen Test-Thrombin (Behring) mit 60 E/ml werden 3 ml Michaelis-Puffer zugegeben, um eine Lösung mit 20 E/ml zu erhalten.

Zu 1 d) Herstellung des Fibrinfilms

Die Oberfläche der Glasplatte wird mit Michaelis-Puffer gereinigt.

Der Cellophanbogen wird in einer Schale mit Michaelis-Puffer angefeuchtet. Dabei ist darauf zu achten, das Cellophan nicht in Falten zu legen, und es nach dem Durchweichen nur abzustreifen. Die Oberfläche des Fibrinfilms würde sonst das selbe Faltenmuster aufweisen. Eine kontinuierliche Schichtdicke des Films wäre dann nicht mehr gewährleistet.

Um das angefeuchtete Cellophan innerhalb der rechteckigen Öffnung des Kunststoffrahmens in enge Verbindung mit der Glasoberfläche zu bringen, wird der Cellophanrand angehoben, das Cellophan innerhalb der Öffnung in alle Ecken ausgestrichen, so dass die zwischen Glas, Rahmen und Cellophan vorhandene Luft entweichen kann.

Puffer, der trotz Abstreifens des Cellophans in der Vertiefung verbleibt, sollte vor dem Eingiessen der Koagulationsmischung etwas abtrocknen; so wird eine Verdünnung der Mischung vermieden.

Beim Eingiessen ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen in der Koagulationsmischung entstehen. Mit einer Pipettenspitze streicht man diese sofort gleichmässig aus und lässt sie festwerden. Der gebildete Film bleibt noch für weitere 10 - 15 Minuten stehen. Danach ist die Oberfläche des Fibrinfilms nahezu trocken und ermöglicht später beim Auflegen auf den Ob-

jektträger eine feste Haftung. Der in Streifen geschnittene Fibrinfilm wird auf die Gewebeschnitte aufgebracht.

Zu 1 e) Herstellung des Gewebeschnittes

Im Inneren des Kryostaten ist auf den kalten Objektträger der gefrorene Schnitt aufzubringen, um ihn mit einem dort aufbewahrten, harten Pinsel ausstreichen und glätten zu können. Von der Unterseite des Objektträgers her wird der Schnitt durch Fingerwärme kurz aufgetaut; die ihn umgebende tiefe Temperatur von -20°C bis -25°C friert ihn aber sofort wieder ein, wodurch eine besonders innige Verbindung zwischen Gewebeschnitt und Objektträger gelingt.

Nach dem Aufziehen auf den Objektträger geben wir den Schnitt in eine feuchte Kammer und bewahren ihn bis zur Verarbeitung im Kryostat auf, da der Gewebeschnitt unbedingt in gefrorenem Zustand mit dem Fibrinfilm zu bedecken ist. Andernfalls muss damit gerechnet werden, dass die beim vorausgegangenen, kurzfristigen Auftauen möglicherweise gesprengten Zellmembranen vorzeitig Aktivator freisetzen.

Zu 1 f) Herstellung des Autographen

Nachdem der Gewebeschnitt mit dem fibrintragenden Cellophan bedeckt ist, wird das Cellophan, noch vor Fixierung und Inkubation (bei $+4^{\circ}$ und $+37^{\circ}\text{C}$) vorsichtig abgezogen.

Das bei Todd (95) beschriebene Vorgehen, das Cellophan erst nach der Inkubation und einer fünfminütigen Formalin-Fixierung vom Fibrin abziehen, liess sich nicht durchführen. Aus nicht erklärlichen Gründen war es zwischen Cellophan und Fibrin zu einer innigen Verbindung gekommen. Am Cellophan blieben ständig grössere Teile des Films haften und wurden mit abgezogen.

Daraufhin lösten wir das Cellophan vor der Fixierung ab. Nach der Inkubation war jedoch die Widerstandsfähigkeit des Fibrinfilms durch die stattgefundene Lyse herabgesetzt. So genügten geringste Haftungen zwischen Cellophan und Fibrin, um den Film zu beschädigen.

Der Zeitpunkt des Ablösens wurde weiter vorverlegt. Die besten Ergebnisse konnten wir verzeichnen, wenn noch vor der Inkubation (bei $+37^{\circ}\text{C}$ wie bei $+4^{\circ}\text{C}$) Cellophan und Fibrin voneinander getrennt wurden. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich zwischen diesen beiden Schichten noch genügend Michaelis-Puffer, um das Cellophan ohne Beschädigung des Films abziehen zu können.

Unserer Ansicht nach ergibt das frühzeitige Entfernen des Cellophans keine Beeinträchtigung der Wirkungsweise des Autographen. Keime dürften durch das beigefügte Cialit keine Veränderungen am Fibrin bewirkt haben.

Die gelegentlich beim Lösen des Cellophans an den Rändern aufgetretenen persistierenden Haftungen mit dem Fibrin sind sofort mit einer Rasierklinge zu trennen. Sonst besteht die Gefahr, dass der Fibrinfilm

- sich vom Objektträger abhebt, und Luftblasen zwischen die Kontaktflächen gelangen,
- in die Länge gezogen wird, keine kontinuierliche Schichtdicke mehr aufweist, und die funktionelle Einheit Gewebeschnitt-Fibrin gestört wird,
- einreißt.

Der Autograph kommt anschliessend in eine feuchte Kammer und wird für 18 - 24 Stunden einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt. Wir erzielen dadurch eine ausreichend lange Aktivierung des Plasminogens bei einer Temperatur, die die Andauung des Fibrins verzögert. Die Lyse kann anschliessend im Brutschrank bei $+37^{\circ}\text{C}$ ungehemmt ablaufen. Über die Zeitdauer dieser Inkubation kann jedoch keine allgemein gültige Angabe gemacht werden. Je nach Aktivität weist das Gewebe bereits nach dem Aufenthalt bei $+4^{\circ}\text{C}$ eine starke Lyse auf. Die Inkubation bei $+37^{\circ}\text{C}$ muss dann entfallen, da eine weitere Fibrinspaltung den Film zerstören würde. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, die Autographen während der Inkubation im Kühlschrank periodisch zu kontrollieren. Wird be-

reits eine Lyse des ungefärbten Präparates entdeckt, sollte man die Inkubation sofort abbrechen und den Autographen in Formalin fixieren.

Ist bei $+4^{\circ}\text{C}$ die Andauung des Fibrins weitgehend unterdrückt und hauptsächlich eine Aktivierung des Plasminogens erfolgt, kommen die Autographen für 5, 10 (max. 15) Minuten in den Brutschrank. Mit diesen Inkubationszeiten erzielten wir die besten Ergebnisse.

3. Zusammenstellung der verwendeten Geräte und Substanzen

a) Geräte:

Kryostat - SLEE

Tiefkühltruhe für Temperaturen von -20°C bis -30°C

Kühlschrank bzw. Kühlkammer für Temperaturen von $+4^{\circ}\text{C}$

Brutschrank für konstante Temperaturen von $+37^{\circ}\text{C}$

Glasplatte 6 mm stark mit den Massen 60 x 45 cm

(In die Plattenecken sollen Nivellierschrauben eingelassen sein. Für unsere Versuche schnitten wir in die Ecken runde Löcher, in die wir 4 - 5 cm lange Kunststoffstäbe so einschoben, dass sie mit der Plattenoberfläche zum Abschluss kamen. In die so gebildeten Kunststofffüsse wurden von unten Gewinde eingeschnitten, und Nivellierschrauben eingedreht, so dass eine absolut waagrechte Oberfläche hergestellt werden konnte.)

Kunststoffplatte, in der Abmessung 14 x 20 x 0,2 cm,
und einer in der Mitte gelegenen Öffnung von
6 x 16 cm.

Wasserwaage (Libelle)

feuchte Kammern (Hierfür eignen sich die Plastikbehälter, in denen die Fibrinogen-Fläschchen geliefert werden. In sie werden feuchte Zellstoffstreifen gelegt.)

Wecker

Glasschale (zum Anfeuchten des Cellophans)
Cuvetten (zum Färben und Fixieren)
Bechergläser 25 und 50 ccm
Messzylinder 100 ccm
Färbebänkchen
Schere
Skalpell
Pinzette
Pinsel
Rasierklänge
Objektträger
Deckgläser
Pipetten (0,2, 2,0, 5,0, 10,0 ml zum Ausblasen bzw. Auslaufen lassen)
Filzschreiber
Glashäckchen (zum Entnehmen des Fibrinogens aus den Fläschchen)
Photomikroskop Zeiss (622)
Blauglas klar 012

b) Substanzen:

Fibrinogen vom Rind (Behring)
Test-Thrombin (Behring)
Michaelis-Veronal-Puffer pH 7,4
Cellophan "PT" 300 - 400
Cialit (Asid-München)
Neutral gepuffertes Formalin 4 %
Harris' Haematoxylin (Papanicolaou I)
Aqua destillata
3%iger ammoniakalischer Alkohol 70 %
Alkohol 96 %
Xylol
Cedax

C. ERGEBNISSE DER EIGENEN METHODE

1. Entstehung von Lysezonen bei der Fibrinolyseautographie

Als Material verwendeten wir ausschliesslich Uterusgewebe. Die zu untersuchenden Gewebestücke entnahmen wir Operationspräparaten nach Hysterektomie und schnitten sie so zurecht, dass sie die ganze Breite des Endometriums, und einen Teil des angrenzenden Myometriums umfassten.

Mit Puffer wurde der Gewebsblock kurz abgespült, sofort mit CO₂-Schnee eingefroren und im Kryostat mit dem Mikrotom in 7 - 9 μ -starke Schnitte zerlegt.

Insgesamt untersuchten wir:

4 Endometriumblastome, 4 myomatös veränderte Uterusgewebe, 1 senilen Uterus, 1 Fibroleiomyom, 2 nicht pathologisch veränderte Uterusgewebe. Von jedem Gewebsblock fertigten wir mindestens 12 Schnitte an, die nach Eindecken mit plasminogenhaltigem Fibrinfilmm, inkubiert wurden. Anhand von ca. 150 Fibrinolyseautographen, die verschiedenen Inkubationszeiten bei +37°C ausgesetzt waren, suchten wir die für die Aktivität des Gewebes und zur Erzielung eindeutig erkennbarer Lysehöfe geeignetste Inkubationsdauer.

TABELLE 1 Massstäbe für die quantitative Auswertung der Standardpräparate und für die Herstellung der Detailaufnahmen. Beziehungen zwischen einzelnen Objektiven des Trockensystems, längstem Objektfeld-durchmesser, betrachteter Originalvergrößerung und wiedergegebener Abbildungsvergrößerung bei Verwendung eines Photomikroskopes Zeiss (622) mit eingebauter Kleinbildkamera 24 x 36 mm. Okular 8fach, Projektion 3,2fach.

Objek- tive	Objektfelddurchmesser der Einstellstrichplatte in mm			Abbildungsvergrößerungen n-fach in Wiedergabe 9 x 12 cm		
Opto- var:	1,25	1,6	2,0	1,25	1,6	2,0
				Originalvergrößerung		
2,5	5,5	4,3	3,4	25 f	32 f	40 f
10	1,45	1,13	0,9	100	125	160

Da wir frisches Gewebe verwendeten, musste bei Anwendung der von Todd (95) angegebenen Inkubationsdauer festgestellt werden, dass die Filmoberfläche über aktivatorreichen Bezirken durch stark ausgeprägte Lyse Defekte aufwies. Zunächst glaubten wir, diese Beschädigungen des Fibrinfilms nicht auf Lyse zurückführen zu können, und sahen sie als Artefakte an (Abb. 6 , 7).

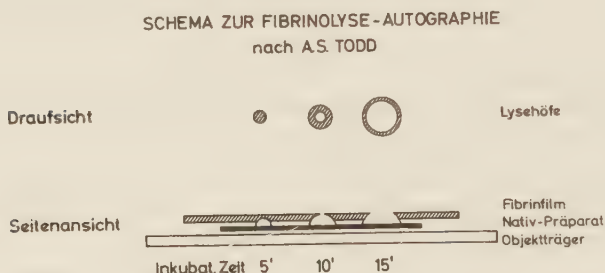


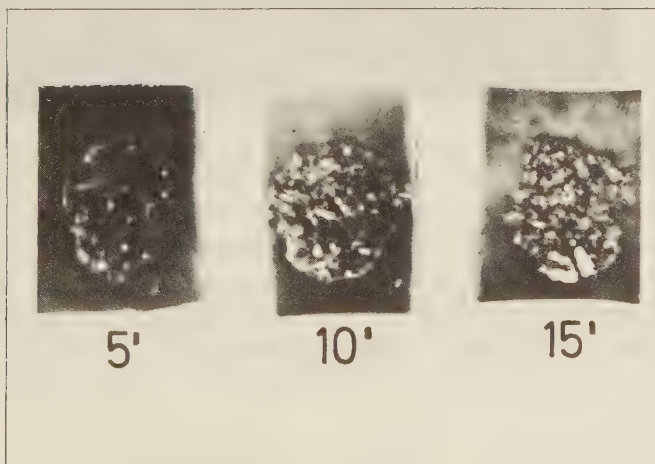
Abb. 4 u. 5 Schematische Vorstellung über die Entstehung von Lysezo-
nen bei der Fibrinolyseautographie nach Todd

Der im Nativschnitt durch nekrobiotische Vorgänge freigesetzte Gewebeaktivator bewirkt im überschichteten Fibrinfilmm durch Aktivierung des Plasminogens zum aktiven fibrinolytischen Enzym eine halbkreisförmige Lyse. Der Radius dieses Lysebezirks ist nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$ - normale Gewebeaktivität vorausgesetzt - kleiner als die Schichtdicke des Films; nach 10 Minuten erreicht er ungefähr die Filmoberfläche. Mit diesen Inkubationszeiten lassen sich deutlich abgrenzbare Lysehöfe erzielen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten hat der Gewebeaktivator so viel Plasminogen in Plasmin überführt, dass eine Lysezone entsteht, deren Radius grösser ist als die Filmdicke. Durch die starke Andauung weist die Filmoberfläche Beschädigungen auf; in der Draufsicht ist nur noch am Rand des entstandenen Hofes eigentliche Lyse zu finden.

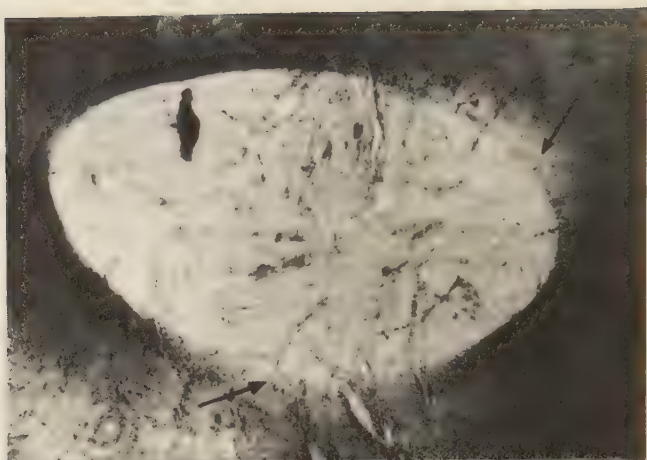
Auf Grund dieser Erfahrungen und angeregt durch Befunde von Ali und Lack (6), dass bei Inkubation von Plasminogen mit einer lysosomenreichen Fraktion 90 % der Aktivierung innerhalb der ersten 5 Minuten stattfindet, kamen wir zu der in Abb. 4 aufgezeigten Vorstellung über die Entstehung der Lysezonen im Fibrinolyseautograph, und verkürzten die Dauer der Inkubation. Die besten Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn wir die Autographen für 5 oder 10 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$ inkubierten (nach vorausgegangener Aufbewahrung für 18 - 24 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$).

Zonen der Andauung waren nach 5-minütiger Inkubation bei $+37^{\circ}\text{C}$ teils deutlich, teils nur andeutungsweise zu erkennen (Abb. 5). Die darunter liegenden Gewebestrukturen schimmerten durch die aufgehellten Lysebezirke, so dass eine genaue Lokalisation der Aktivatoren möglich war.

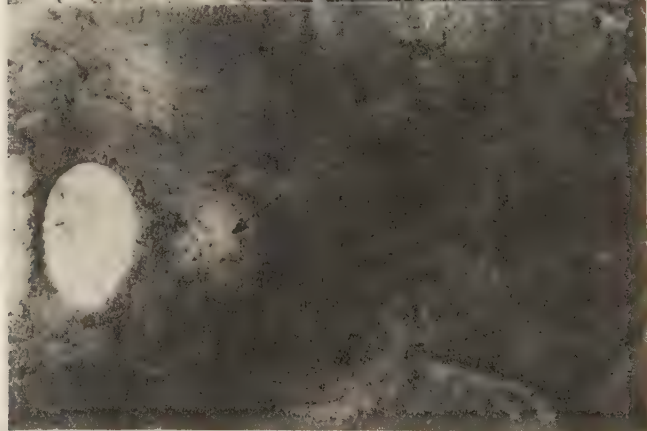
Wurde die Inkubation auf 10 Minuten ausgedehnt, waren insgesamt mehr Andauungszonen sichtbar (Abb. 5). Gewebsbezirke, über denen das Fibrin nach Inkubation von 5 Minuten keine oder nur schwache Lyse aufwies, riefen nun geringe oder deutlich ausgeprägte Andauungszonen hervor. Andererseits war der Film an Stellen, die bei 5 Minuten deutliche Lyse zeigten, jetzt zum Teil beschädigt. Die halbkreisförmige Lyseausdehnung hatte bereits die Oberfläche des Fibrinfilms erreicht.



6



7



Bei Inkubation von 15 - 30 Minuten konnten wir feststellen, dass einmal viele Herde konfluieren, zum anderen die defekten Stellen im Film zahlreicher waren. Nur am Rande der Lysehöfe war eigentliche Fibrinandaung erkennbar (Abb. 5, 6, 7). In den ausgedehnten Lysebezirken fand sich, auf Grund der stattgefundenen Nekrobiose, nur noch ein undeutliches Gewebebild. Eine exakte Beziehung zwischen Lyse und histologischer Struktur konnte nicht mehr hergestellt werden.

- Abb. 6 Schnitt durch Myometrium einer 43jährigen Frau mit nicht pathologisch verändertem Uterusgewebe
 Inkubationszeiten des Autographen: 36 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$,
 anschliessend 30 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.
 Im überschichteten Fibrinfilmm tritt ein ausgedehnter Lyseherd auf, in dessen Bereich die Filmoberfläche vollkommen andauert und zerstört ist. Nur noch am Rand der Andauungszone ist eigentliche Lyse (Pfeile) zu erkennen. Harris' Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar 012, 32fach.
- Abb. 7 Schnitt durch Myometrium mit randständigem Endometrium einer 43jährigen Frau mit nicht pathologisch verändertem Uterusgewebe
 Inkubationszeiten des Autographen: 36 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$,
 anschliessend 15 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.
 Fibrinfilmm zeigt echte perivaskuläre Lyse (Pfeil) in der Muscularis, daneben unechte Lyse, die als Artefakt (A) durch Beschädigung der Filmoberfläche anzusehen ist. Harris' Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar 012, 25fach.
-

Im weitaus grössten Teil der angefertigten Autographen konnte eine Andauung des plasminogenhaltigen Fibrinfilms gezeigt werden. Lediglich Gewebestücke, die bis zur Verarbeitung nicht adäquat aufbewahrt, oder aus senilem Uterus entnommen wurden, zeigten keine lytische Aktivität. Von einer Abnahme der Gewebeaktivatoren des Uterus im Alter berichten verschiedene Autoren (3, 33, 42, 74).

Wurde auf 80°C erhitztes und somit plasminogenfreies Fibrin (49) als Substrat für Proteasenaktivität verwendet, konnte im Film keine Andauung beobachtet werden. Daraus ziehen wir den Schluss: die lytische Aktivität des Uterusgewebes ist einem Plasminogenaktivator zuzuschreiben, und wird nicht durch vorgebildetes Plasmin oder unspezifische Proteasen verursacht.

2. Verteilung fibrinolytischer Aktivität im Uterusgewebe

Über die Verteilung fibrinolytischer Aktivität bzw. über die histologische Lokalisation der Gewebeaktivatoren können wir folgende Angaben machen:

Im Myometrium der untersuchten Gewebe fanden wir Gewebeaktivatoren der Fibrinolyse. Der Fibrinfilmm wies über diesem Gewebeanteil aktive Lyse auf. Bereits bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$

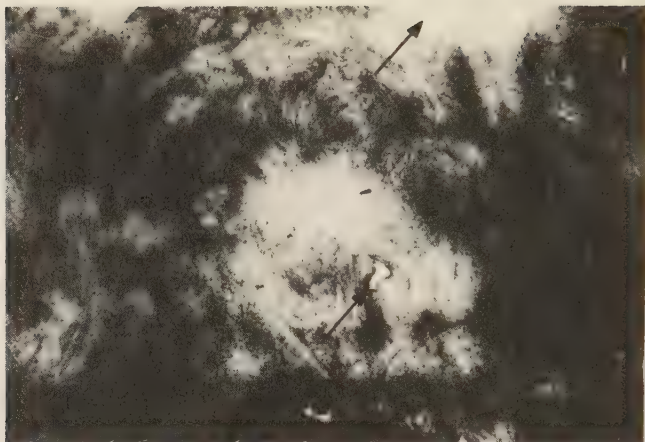


Abb. 8 Schnitt durch Myometrium einer 51jährigen Frau mit Uterus myomatosus

Inkubationszeiten des Autographen: 18 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$, anschliessend 5 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.

Im Fibrinfilmm treten disseminierte, fokale, um das zentrale und randständige Gefäss (Pfeile) mehr konfluierende Lysezonen auf. Wegen starkem Gewebeerfall (Nekrobiose) zeigen die perivasalen Lysebezirke keine deutliche histologische Struktur mehr. Harris' Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar 012, 32fach.

Abb. 9 Gleiches Gewebe wie in Abb. 8

Inkubationszeit des Autographen: 30 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.

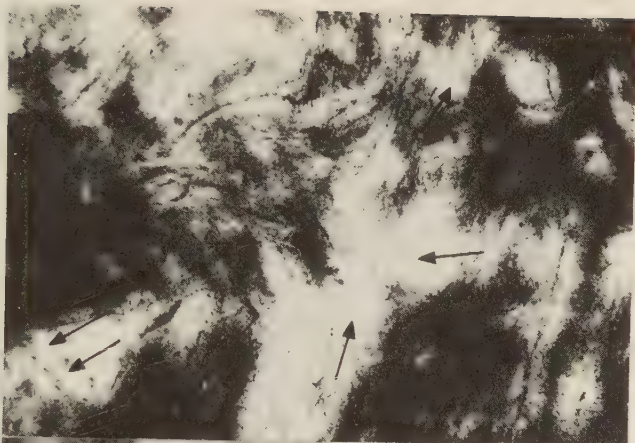
Der Fibrinfilmm weist stark konfluierende Andauungszonen auf. Trotz undeutlicher Gewebestruktur innerhalb der Lysehöfe, können die Herde den zwischen Ring- und Längsmuskulatur verlaufenden Gefässe (Pfeile) zugeordnet werden. Keine vorausgegangene Inkubation bei $+4^{\circ}\text{C}$, wodurch vor allem aktivatorreiche Gewebestrukturen zur Darstellung kommen. Harris' Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar 012, 32fach.

Abb. 10 Nativschnitt durch Myometrium und basales Endometrium einer 50jährigen Frau mit nicht pathologisch verändertem Uterusgewebe

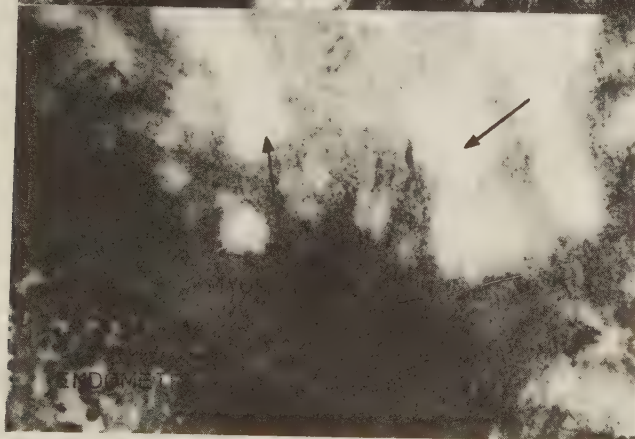
Inkubationszeiten des Autographen: 20 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$, anschliessend 15 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.

Streng perivasal lokalisierte Lysehöfe verschiedener Grösse im Myometrium (Pfeile zeigen Gefässe), während Endometrium und Basalis fibrinolytisch stumm sind. Harris' Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar 012, 25fach.

9



10



entstanden disseminierte, fokale Lyseherde um Äste der Art. uterina und um Venen, die zwischen der Längs- und Ringmuskulatur des Uterus verlaufen (Abb. 8 - 14).

Die Basalis - Grenzschrift zwischen Endo- und Myometrium - war bei allen Präparaten inaktiv (Abb. 10 - 13). Das überschichtete Fibrin zeigte keinerlei Lyse und blieb gleichmässig dunkel gefärbt. Die Bedeutung der Basalis-Inaktivität für die uterine Haemostase bei den zyklischen Funktionsblutungen wurde bereits in der Einleitung erwähnt.

11

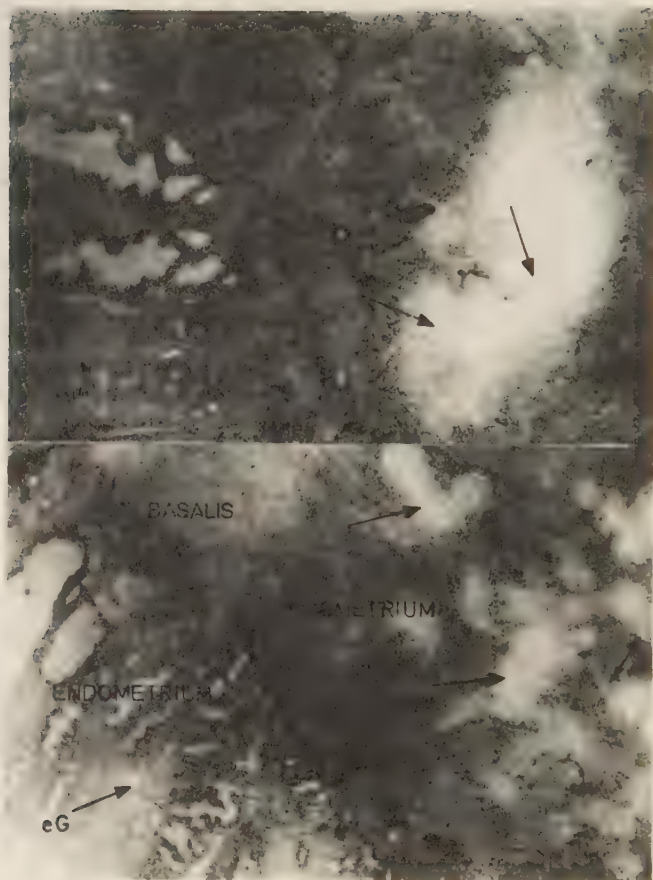


Abb. 12 Gleiches Gewebe wie in Abb. 10, andere Einstellung
 Inkubationszeiten des Autographen: 20 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$,
 anschliessend 15 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.
 Disseminierte (Pfeile) Lyse im Myometrium. Endometrium
 zeigt fibrinolytische Aktivität um ein kleines Gefäss (eG),
 während endometriale Drüsen und Basalis inaktiv sind. Harris'
 Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar 012, 25fach.

- Abb. 11 Schnitt durch Myometrium und Endometrium einer 63jährigen Frau mit Uterus myomatosus

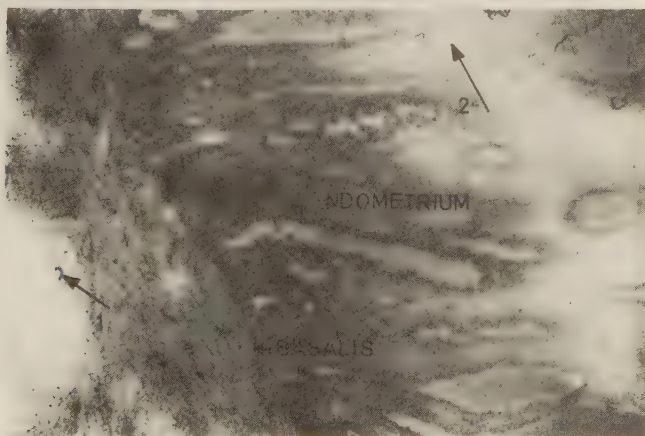
Inkubationszeiten des Autographen: 24 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$,
anschliessend 10 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.

Überschichteter Fibrinfilz zeigt ausgeprägte fibrinolytische Aktivität um Gefässe (Pfeile) des Myometriums. Basalis und Endometrium sind fibrinolytisch stumm. Harris' Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar 012, 25fach.

- Abb. 13 Schnitt durch Myometrium und basales Endometrium einer 36jährigen Frau mit nicht pathologisch veränderten Uterusgewebe

Inkubationszeiten des Autographen: 24 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$,
anschliessend 10 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.

Im Myometrium zeigt sich fibrinolytische Aktivität als heller, entfärbter Bezirk um Stromagefäss (Pfeil 1). Im Endometrium finden sich ineinander überfliessende Lysezonen mit unscharfen Rändern (Pfeil 2; endometriales Gefäss). Beide fibrinolytisch aktiven Gewebeanteile werden durch die inaktive Basalis getrennt. Harris' Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar 012, 25fach.



13

Dagegen wies das Endometrium fibrinolytisch aktive Substanzen auf. Das Fibrin über diesem Teil des Gewebeschnittes zeigte jedoch in geringerem Masse Zonen der Andauung, als dies im Myometrium der Fall war. Ausserdem benötigten wir für das Endometrium längere Inkubationszeiten,

um die Fibrinolyse in Gang zu bringen (Abb. 16). In einigen Fällen war überhaupt keine Lyse zu erkennen, und das Endometrium blieb stumm (Abb. 10, 11).

Auch im Endometrium fand sich eine perivasale Lokalisation der Plasminogenaktivatoren. Endometriale Drüsen zeigten keine fibrinolytische Aktivität. Übereinstimmend mit Todd konnten wir die Beobachtung machen, dass nach Inkubation bei $+37^{\circ}\text{C}$ im Endometrium kleine, herdförmige Lyse-

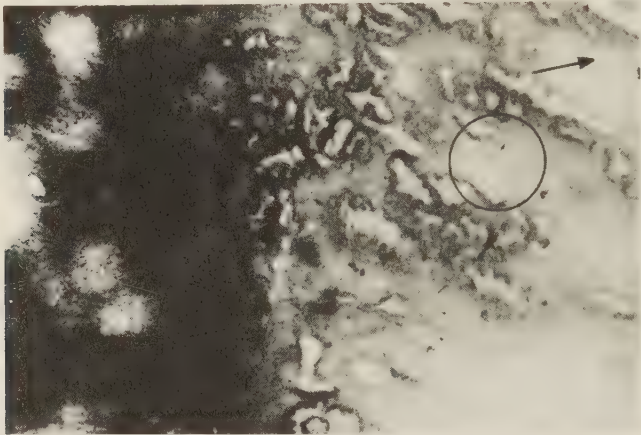


Abb. 14 Schnitt durch Muscularis und Funktionalis einer 60jährigen Frau mit Fibroleiomyom
Inkubationszeiten des Autographen: 22 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$, anschliessend 12 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.
Disseminierte, fokale Lysehöfe um Gefässe des Myometriums und fibrinolytische Aktivität um solche des Endometriums (Kreis u. Pfeil). Basalis und endometriale Drüsen sind inaktiv. Harris' Haematoxylin, Blaufilter; Blauglas klar Ol2, 25fach.

Abb. 15 Schnitt durch Funktionalis einer 36jährigen Frau mit nicht pathologisch verändertem Uterusgewebe
Inkubationszeiten des Autographen: 24 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$, anschliessend 10 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.
Zwischen den langgezogenen Drüsenschläuchen findet sich ausgedehnte fibrinolytische Aktivität, lokalisiert um Stroma-gefässe des Endometriums (Kreis). Harris' Haematoxylin, Blaufilter; Blauglas klar Ol2, 40fach.

15

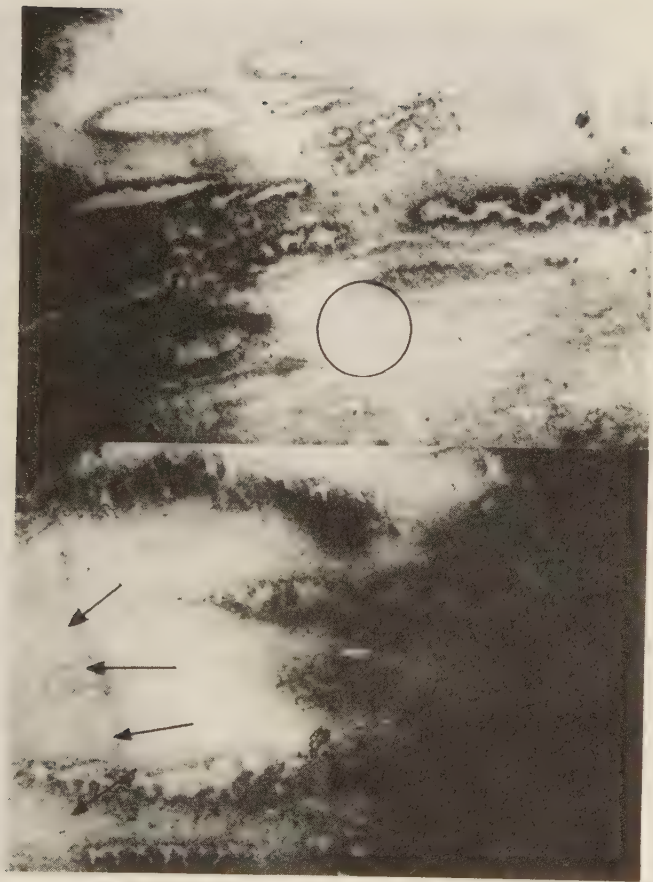


Abb. 16 Schnitt durch Funktionalis samt angrenzender Basalis einer 51jährigen Frau mit Uterus myomatosus
 Inkubationszeiten des Autographen: 20 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$,
 anschliessend 20 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.
 Im gefärbten Fibrinfilmm erscheinen nicht sicher voneinander
 abgrenzbare Lyseareale, die aber mit Gefässen (Pfeile) des
 Endometriumstromas in bezug gebracht werden können. Fibrino-
 lytische Inaktivität von Basalis und endometrialen Drüsen.
 Harris' Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar Ol2, 32fach.

17

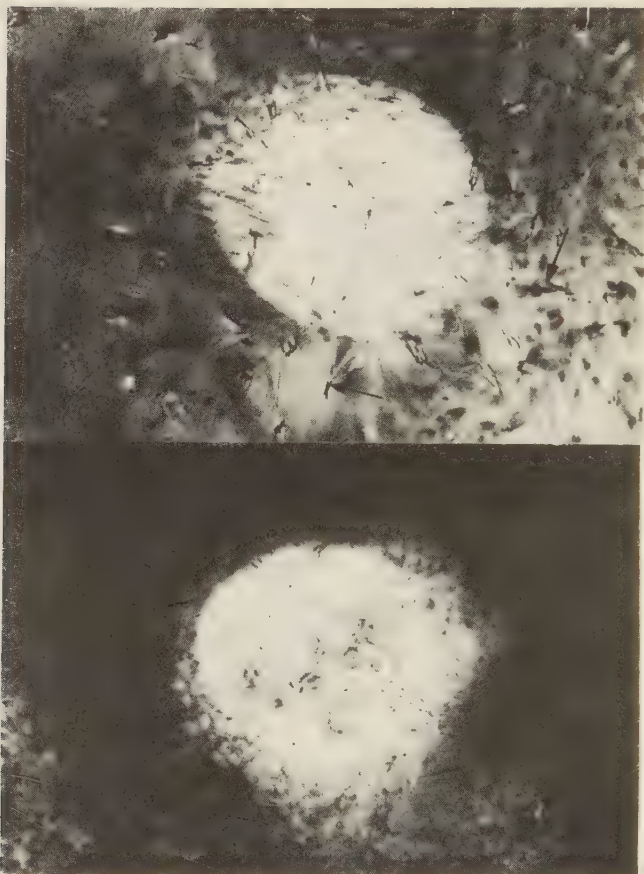


Abb. 18 Schnitt durch Myometrium einer 43jährigen Frau mit Uterus myomatosus
 Inkubationszeiten des Autographen: 18 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$,
 anschliessend 10 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.
 Starke fibrinolytische Aktivität um ein Gefäss der Muscularis. Der Film weist körnige Struktur auf infolge Fibrinausfall wegen zu langer Aufbewahrung des inkubierten, fixierten und gefärbten Autographen. Im Bereich der Lyse keine derartigen Artefakte, da hier Fibrin durch das fibrinolytische Enzym Plasmin gespalten wurde. Harris' Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar Ol2, 32fach.

Abb. 17 Schnitt durch Myometrium einer 60jährigen Frau mit Fibroleiomyom
Inkubationszeiten des Autographen: 24 Stunden bei +4°C, anschliessend 10 Minuten bei +37°C.
Perivaskuläre Lysezone als Ausdruck ausgedehnter fibrinolytischer Aktivität. Durch zu lange Aufbewahrungszeit ist Fibrin ausgefallen (Pfeile). Innerhalb der Lysezone fehlt diese Beeinträchtigung des Films, da hier Fibrin durch Plasmin in seine Spaltprodukte übergeführt wurde. Harris' Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar 012, 32fach.

zonen entstanden, die mehr in den tieferen Schichten des Endometriums, speziell um kleine Venen und Kapillaren, auftraten (Abb. 12 - 16).

Abgesehen von der Gefässlokalisation (1, 17, 43, 45, 57, 84, 91, 93) fand Todd (93, 94) ausserdem eine diffuse Aktivität im Endometriumsstroma, die besonders das subepitheliale Gebiet bzw. die obere Endometriumhälfte betrifft (45, 57). Wir konnten keine derartige diffuse Aktivität beobachten und möchten annehmen, dass die Aktivatoren des Endometriums ebenfalls nur perivaskulär lokalisiert sind (Abb. 12 - 16).

Zusammenfassend können wir sagen:

- Die Gewebeaktivatoren der Fibrinolyse sind nicht über den ganzen Uterus verteilt.
- Im Uterusgewebe ist die fibrinolytische Aktivität auf die Blutgefässe des Myo- und Endometriums beschränkt und kann nicht in anderen Zellstrukturen entdeckt werden.

Zur Frage, ob das Karzinom-Gewebe selbst Plasminogenaktivatoren enthält, haben bisher nur wenige Autoren Stellung genommen. Nur bei Clifton (21) und Schuler (83) sind Angaben zu finden, dass im Karzinom plasminaktivierende Stoffe nachzuweisen sind. Ähnliches berichtet Schmidt-Mathiesen, lässt jedoch die Frage offen, ob die fibrinolytische Aktivität in Karzinom-Zellen selbst lokalisiert ist, oder von ihnen im angrenzenden Bindegewebe induziert wird (81).

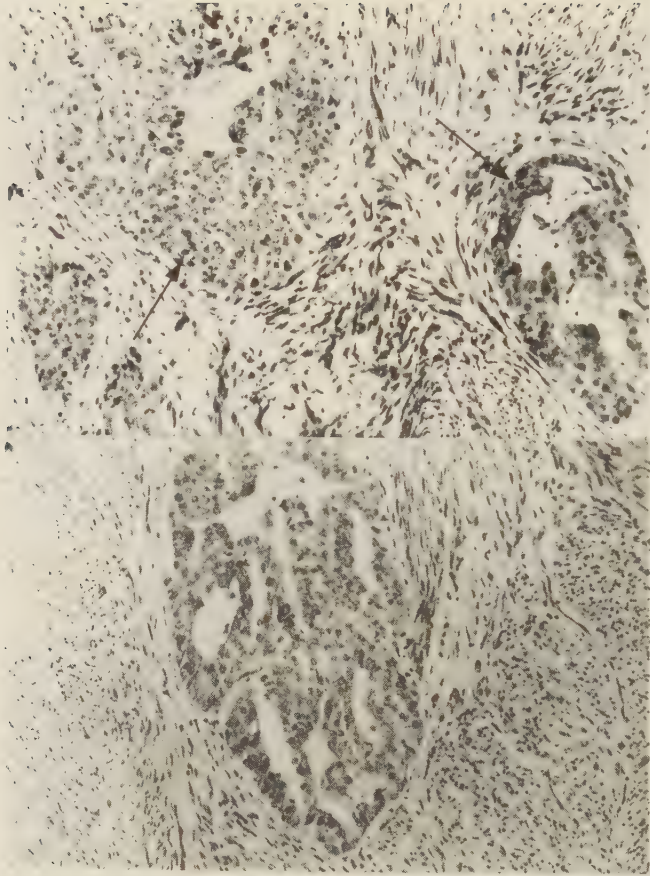


Abb. 19 u. 20 Schnitt durch das Myometrium einer 69jährigen Frau mit Adeno-Karzinom
Keine Überschichtung mit plasminogenhaltigem Fibrinfilm. Angeschnittene Karzinom-Nester (Pfeile) mit umgebendem Bindegewebe und quergetroffenen Muskelfasern des Myometriums. Harris' Haematoxylin, 100fach.

Abb. 21 Gleiches Gewebe wie Abb. 19 u. 20
Inkubationszeiten: 22 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$, 10 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$. Über den karzinomatös entarteten Drüsenschläuchen (Pfeile) lässt sich keine Lyse nachweisen; das Endometriumblastom ist fibrinolytisch inaktiv. Harris' Haematoxylin, Blaufilter: Blauglas klar 012, 25fach.

21

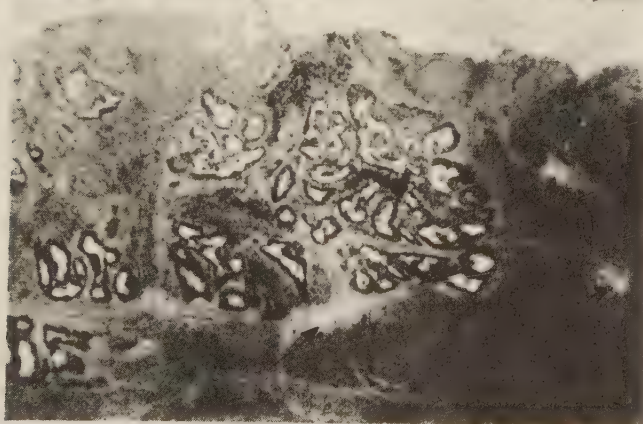
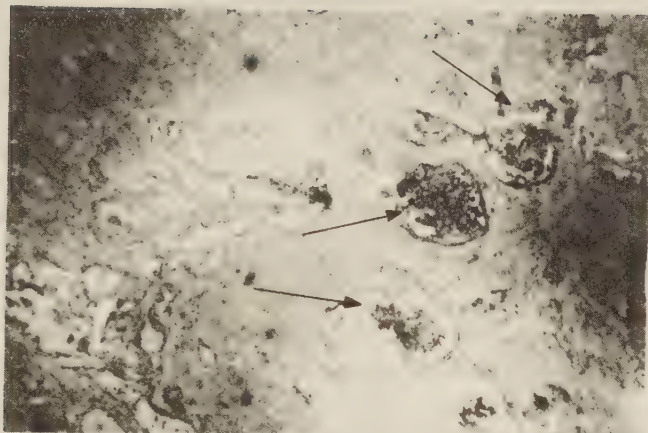


Abb. 22 Schnitt durch Myometrium einer 63jährigen Frau mit Adeno-Karzinom
 Inkubationszeiten des Autographen: 20 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$,
 anschliessend 5 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.
 Karzinomatös entartetes Gewebe und umgebende Gefässe zei-
 gen keinerlei Lyse. Im Vergleich mit dem Diapositiv sind
 die in den Ablichtungen erkennbaren Aufhellungen fototech-
 nische Artefakte (Pfeile), stellen also keine Lyse dar.
 Harris' Haematoxylin, Blaufilter; Blauglas klar 012, 32fach.

Berücksichtigt man die verbreitete Annahme, dass eine Gewebsläsion, Änderungen des Zellstoffwechsels oder der Zelloberfläche zur Freisetzung von Aktivatoren führt, so drängt sich im Hinblick auf das destruierende Wachstum vieler Neoplasmen und den Karzinom-Stoffwechsel der Gedanke an Liberierung von Fibrinolyseaktivatoren im betroffenen Bindegewebe geradezu auf.

Dennoch konnten wir im Rahmen unserer Versuche am Endometriumblastom keinerlei fibrinolytische Aktivität erkennen (Abb. 21 - 23). Obwohl das Adeno-Karzinom zwar durchblutet ist und sicherlich auf Gefässe hat, war der Fibrinfilz über dem karzinomatösen Bezirk nie angedaut; auch nicht nach längerer Inkubation bei $+37^{\circ}\text{C}$. Das Adeno-Karzinom besitzt keine autochthonen Gewebeaktivatoren. Es ist inaktiv, weil es keinen Aktivator hat, oder ihn verbraucht.

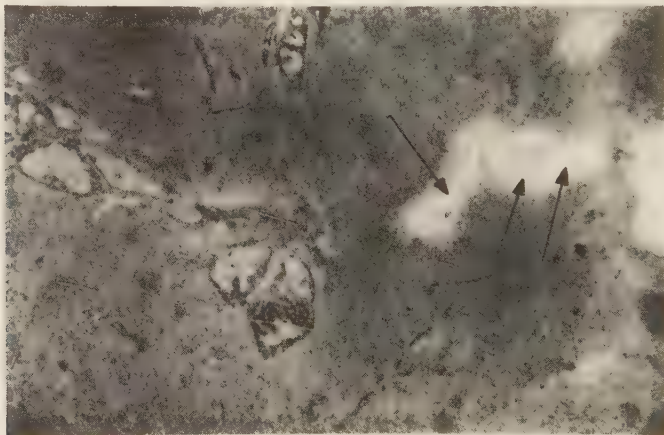


Abb. 23 Schnitt durch Myometrium einer 55jährigen Frau mit Adeno-Karzinom
Inkubationszeiten des Autographen: 22 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$,
anschliessend 10 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$.
Karzinom-Nester lösen im überschichteten Fibrin keine Lyse
aus. Dagegen lässt sich um benachbarte Gefässe (Pfeile) fi-
brinolytische Aktivität nachweisen. Harris' Haematoxylin,
Blauglas: Blauglas klar 012, 25fach.

D. DISKUSSION

1. Die Fibrinolyseautographie als histochemische Methode

Die Fibrinolyseautographie nach A. S. Todd ist eine semiquantitative, histochemische Methode zur Lokalisation der Plasminogenaktivatoren im Gewebe. Durch Gewebe- oder Stoffwechselalteration im Schnitt kommt es infolge Lysosomeninsult (6, 17, 81) zur Freisetzung der Aktivatoren (Abb. 2). Als Zeichen fibrinolytischer Aktivität treten im überschichteten plasminogenhaltigen Fibrinfilmm Lysezonen auf, die topographisch bestimmten Strukturen des darunterliegenden Gewebeschnitts zugeordnet werden können.

Im plasminogenfreien Hitzefibrin (49) konnte keine fibrinolytische Aktivität festgestellt werden, so dass die Andauungszonen auf spezifische Plasminogenaktivatoren des Gewebes, und nicht auf aktive Enzyme (vorgebildetes Plasmin, Tryptasen, unspezifische Proteasen) zurückzuführen sind (3, 15, 43, 45, 62, 74, 75, 93, 94). Unspezifisch wirkende Enzyme hätten ebenso wie Plasmin auf dem plasminogenfreien Film eine Reaktion zeigen müssen. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Möglichkeit der autokatalytischen Plasminogenaktivierung durch bereits gebildetes Plasmin besteht.

Auch erlaubt es der negative Ausfall des Lassen-Testes nicht, auf ein völliges Fehlen von aktiven Enzymen zu schliessen, da beim Erhitzen durch Denaturierung des Fibrins die Sensibilität des Films vermindert wird, und nicht zum Nachweis geringer Enzymaktivitäten geeignet ist (81, 82, 86, 97). Nach Lassen (49) ist die Auswirkung der Denaturierung nicht übermässig gross, dagegen gibt Stamm (86) einen Empfindlichkeitsverlust bis zu 90 % an.

Zur Klärung sollten weitere Versuche angeschlossen werden, in denen der Fibrinfilmm - statt auf +80°C erhitzt - mit Fibrinolyseinhibitoren zu überschichten wäre.

Mit einem biologischen Kallikrein-Trypsin-Inaktivator aus Rinderparotis (= Trasylol) (55, 59), oder mit synthetischen Inhibitoren wie Epsilon-Aminokapronsäure (EACA) (6, 7, 53, 57, 61, 68), Aminomethylcyclohexankarbonsäure (AMCHA) und Para-Aminomethylbenzoesäure (PAMBA) (52) lässt sich die lokale Wirkung der Plasminogenaktivatoren des Ge-

webes für begrenzte Zeit blockieren (56). Die Angriffspunkte der Inhibitor-Typen im fibrinolytischen System sind hinreichend bekannt (7a, 18a, 59). Trasylol inhibiert einmal die Aktivierung von Plasminogen, zum anderen wird Plasmin direkt inaktiviert (58, 59) (Abb. 1). Mit EACA und AMCHA, beides w-Aminosäuren, lassen sich besonders die Gewebeaktivatoren der Fibrinolyse hemmen (38). Aktiviertes Plasmin wird nicht beeinflusst. Eine Hemmung der unspezifischen Proteasen erfolgt nicht.

Würde der Fibrinfilm mit einer dieser beiden Aminosäuren überschichtet, könnten vorhandene unspezifische proteolytische Enzyme eine Lyse bewirken. Der negative Ausfall dieses Inhibitor-Überschichtungstestes erlaubte dann, auf ein Fehlen von aktiven, unspezifischen Proteasen zu schliessen.

Die Fibrinolyseautographie stellt im eigentlichen Sinne eine topische Methode dar, die Gewebe als Indikator für die Lokalisation von Aktivatoren benützt. In der Histochemie findet sich als vergleichbare Methode die Autoradiographie (35). Hierbei wird zum Nachweis der Radioaktivität ($\hat{=}$ Aktivatoren des Gewebes) eine Photoemulsion ($\hat{=}$ plasminogenhaltiger Fibrinfilm) verwendet, die in engem Kontakt mit Gewebe von Versuchstieren, denen zuvor ein Radioisotop verabfolgt wurde, exponiert wird. Radioaktive Strahlung ($\hat{=}$ gebildetes Plasmin) führt dann in Photoemulsion ($\hat{=}$ Fibrinfilm) zu einer Schwärzung ($\hat{=}$ Lyse), deren Ausmass und Verteilung Rückschlüsse zulässt auf Menge und Lokalisation des Radioelements ($\hat{=}$ Plasminogenaktivatoren) im Gewebe.

Von besonderer Bedeutung ist, dass es sich bei dem zu untersuchenden Material um überlebendes Gewebe handelt. Fibrinolytische Aktivität wird gewissermassen an zugrunde gehendem Gewebe nachgewiesen. Deshalb ist es für das Ergebnis der Fibrinolyseautographie sehr wichtig, auf welche Weise das Gewebematerial von der Entnahme bis zur Verarbeitung konserviert wird (76). Als Kriterium für einen noch sinnvollen Enzymnachweis können morphologisch fassbare Strukturzerstörungen, wie Karyorrhexis oder Karyolyse, dienen. Nach dem Einsetzen dieser autoly-

tischen Strukturveränderungen ist ein histochemischer Enzymnachweis auf keinen Fall mehr möglich (34).

Am Beginn der Gewebekonservierung steht das Einfrieren. Mit Unterschreitung von -30°C ist ein Stillstand nahezu aller Lebensprozesse erreicht, die zu chemischen und morphologischen Veränderungen führen können. Die Unversehrtheit der Struktur in histologischen Präparaten hängt wesentlich von den Umständen des Einfrierens ab (51, 77).

Physikalische Vorgänge beim Einfrieren lebenden Gewebes: Erstarren Flüssigkeiten zu festen Körpern, kann dies in kristalliner Form erfolgen, wobei die Moleküle in Kristallgitter eingebaut werden, oder in amorpher Form, in der die ursprünglich ungeordnete Molekülanordnung beibehalten wird. Zur Kristallisation kann es nur in Nähe des Gefrierpunkts der betreffenden Flüssigkeit kommen, nicht jedoch bei wesentlich tieferer Temperatur. Die Bewegungsenergie der Moleküle reicht dann nicht mehr aus, sie an ihre Plätze im Kristallgitter zu führen. Sollen Flüssigkeiten in amorpher Form erstarren, muss der Wärmeentzug sehr schnell erfolgen (65, 72).

Bei langsamem Einfrieren beginnt die Eisbildung extrazellulär. Dabei können Eiskristalle von mehreren μ -Grösse heranwachsen (51, 60, 63), die zu Zerreissung des Gewebes in mikroskopischen Dimensionen führen (25, 72). Die von ihnen eingenommenen Räume können später als Vakuolen sichtbar sein, quellen aber meist auch wieder zu, wenn eingefrorenes Gewebe wieder auftaut (64). Die Zerstörung wird so zwar morphologisch maskiert, aber histochemisch ist ausser den Strukturveränderungen (60) eine Beeinflussung des feinen Chemismus, besonders der Proteine, und auch der Lokalisation einzelner Gewebskomponenten möglich (64, 65).

Die zwischen den Zellen gelagerten Kristallisationskeime sind osmotisch wirksam und entziehen den Zellen Wasser (66, 72). Dabei kann es durch Diffusionsströme zu Substanzverlagerungen und durch Erhöhung der Salzkonzentration zur Gefährdung der empfindlichen Enzyme kommen (34, 63, 64, 65). Veränderung der Konzentration einzelner Bestandteile im Gewebe (etwa durch Herausdiffundieren) wirkt sich vor allem bei quantitativen Methoden deletär aus.

Eine wichtige Voraussetzung für die Erzielung verlässlicher histochemischer Resultate ist also eine Vorbehandlung des Gewebes, welche die Gewähr bietet, die nachzuweisenden Stoffe

- chemisch unverändert
- ortsrichtig (keine Diffusions- und Adsorptionsartefakte, die durch Verlagerung von Aktivatoren oder Inhibitoren zu lokalisatorisch falschen Reaktionsergebnissen führen müssten)
- quantitativ richtig (keine Konzentrationsveränderung einzelner Bestandteile im Gewebe)

in einem

- strukturell einwandfreien (keine Autolyse)
- dimensionsmässig unveränderten Gewebeschnitt

vorzufinden.

Schnelles Einfrieren, bei dem die Grösse der entstehenden Eiskristalle unter submikroskopischen Dimensionen bleibt (63), lässt sich ausschliesslich mit Hilfe sehr tiefer Temperaturen erzielen, und ist praktisch nur an sehr kleinen Gewebestückchen zu erreichen (25, 66). Für die Fibrinolyseautographie benötigten wir jedoch meist den Querschnitt durch die gesamte Uteruswand, um die fibrinolytische Aktivität von Endometrium, Basalis und Myometrium im Zusammenhang untersuchen zu können. Diese Gewebestücke waren für ein artefaktfreies Einfrieren ohne Eiskristalle sicherlich zu gross. Ausserdem erreichten wir keine ausreichend tiefen Temperaturen, um schnell Einfrieren zu können. Wir müssen deshalb in den einzelnen Schnitten mit Beeinträchtigung der Gewebeaktivatoren oder mit teilweiser Inaktivierung des Aktivators durch Artefaktbildung rechnen.

Schliesslich handelt es sich bei der Fibrinolyseautographie um eine Methode, die einen Enzymnachweis erfordert. Sie benutzt dabei nicht - wie ein markierter Enzymnachweis - eine Vorstufe, die dann im lebenden Gewebe eingebaut wird, sondern eine Reaktion des Gewebes.

2. Abhängigkeiten der Fibrinolyse

Die Anwesenheit und Konzentration eines Enzyms wird im allgemeinen indirekt durch Erfassung der enzymatischen Aktivität bestimmt. Diese wiederum kann - bei gleichartigen Reaktionsbedingungen - am Ausmass der chemischen Veränderungen festgestellt werden.

Für den Nachweis des enzymatischen Vorganges, und somit die Lokalisation der Plasminogenaktivatoren, verwendet man also die Fibrinolyse im Film.

Die Fibrinolyse im Film - sichtbar durch Aufspaltung des gefärbten Fibrins in seine farblosen Spaltprodukte - ist nun abhängig von:

a) Konzentration des Gewebeaktivators

Die Umsatzzahl der Plasminogenaktivierung durch den Gewebeaktivator ist abhängig von der Konzentration des Gewebeaktivators (61).

b) Plasminogengehalt des Fibrinfilms

- Vorhandensein von Plasminogen: Da im Todd'schen Autographen die Fibrinolyse an einem Fremdsupstrat (Rinderfibrinogen) abläuft, muss vorausgesetzt werden, dass Plasminogen vorhanden ist. Wie wir wissen, besitzt Plasminogen eine starke Adsorptionstendenz zu Fibrinogen und etwas schwächer zu Fibrin (86, 89). So muss angenommen werden, dass das verwendete Rinderfibrinogen (Behring) stets eine gewisse Menge Plasminogen enthält.
- Plasminogenkonzentration: Da die Konzentration des Substrats (Plasminogen) das Ausmass der enzymatischen Aktivität beeinflusst (23), führt eine Erhöhung der Substratkonzentration, bei gleichbleibender Konzentration des Enzyms (Aktivator), zur Steigerung des Reaktionsproduktes. Deshalb ist möglicherweise die Ergiebigkeit der Fibrinolyseautographie und eventuell auch die Sensibilität des Films zu steigern, wenn der Plasminogengehalt im Film künstlich erhöht wird.

Für die exakte Aktivatorlokalisation ist es von besonderer Wichtigkeit, dass das Plasminogen im Fibrinfilm gleichmässig verteilt ist, und keine unterschiedlichen Konzentrationen aufweist.

Im verwendeten Film ist das aktivierbare Substrat Plasminogen ge-

wissermassen in seiner natürlichen Konzentration vorhanden und, infolge der Adsorptionstendenz zu Fibrin, unmittelbar abhängig von der Fibrinkonzentration. Wird nun der Substratgehalt im Film künstlich erhöht, erzeugt man unter Umständen eine gar nicht erkennbare Diskontinuität. Auf der einen Seite wäre viel Plasminogen gebunden, auf der anderen weniger. Starke bzw. geringe Lyse könnte so vorge-täuscht werden.

c) Inhibitoren

Es ist durchaus denkbar, dass im verwendeten Rinderfibrinogen oder in angeschnittenen Gefässen des Gewebeschnittes Spuren von plasma-tischen Inhibitoren (vorwiegend Alpha-2-Makroglobulin und Alpha-1-Antitrypsin) vorhanden sind (28), die entweder bereits die Aktivie-rung des Plasminogens oder die Plasminwirkung hemmen (30, 89). Über gewebliche Inhibitoren (Antiaktivatoren) ist bis jetzt wenig bekannt (28).

In diesem Zusammenhang sei auf die umgekehrte Proportionalität zwischen fibrinolytischer Aktivität und dem Gehalt der Grundsub-stanz an freien, sauren Mucopolysacchariden hingewiesen (81). Es wird angenommen, dass nach Austritt aus den Zellen die Fibrinolyse-aktivatoren, die als Lipoproteide zu definieren sind, durch Grund-substanzteile - wahrscheinlich saure Mucopolysaccharide - komplex gebunden werden und dadurch ihren Einfluss auf die Fibrinolyse ver-lieren.

Unter Einfluss der Inhibitoren entspräche dann das Ausmass der im Fibrinfilm nachgewiesenen Lysehöfe nicht mehr der autochthonen fi-brinolytischen Aktivität. Gewebsbezirke mit geringem Aktivatorge-halt würden so stark gehemmt, dass im überschichteten Film keine Ly-se zu erkennen wäre. Das fibrinolytische Potential des zu untersu-chenden Gewebes - nachgewiesen anhand der Fibrinolyse - wäre demnach die Resultante aus Aktivierung und Inhibierung.

d) pH-Wert

Proteine sind polyvalente, bipolare Ionen, deren Dissoziation vom pH-Wert des umgebenden Mediums abhängt. Vom Ausmass der Dissoziation

(bzw. elektrische Ladung des Proteins) wird die enzymatische Aktivität bestimmt (6, 23). So hängt möglicherweise auch bei der Fibrinolyseautographie nach Todd, wie bei jedem enzymologischen Prozess, die Aktivität des Enzyms (Aktivatoren des Gewebes) vom pH-Wert des Milieus ab.

Dabei scheint eine Veränderung des pH-Werts zu einer Änderung der Substrataffinität des Enzyms zu führen, und die Geschwindigkeit der enzymatisch gesteuerten Reaktion zu beeinflussen (23).

Wir haben solche pH-Abhängigkeiten nicht geprüft. Wir wissen jedoch aus Untersuchungen über den Einfluss des pH-Werts auf die Gewebeaktivität, dass Aktivierung menschlichen Plasminogens maximal bei pH 9,0 erfolgt (6).

Gelegentlich machten wir die Feststellung, dass der Fibrinfilm eine weiche, gummiartige Konsistenz aufwies. Zunächst angenommene unterschiedliche Konzentrationen des Test-Thrombins oder Fibrinogens schieden nach Rückfrage bei der Herstellerfirma als Ursache aus. So wären letztlich Schwankungen im pH-Wert des Michaelis-Puffers zu diskutieren.

e) Dicke des Gewebeschnitts

Die Stärke des Gewebeschnittes ist für die Konzentration des Aktivators entscheidend. Wird die Schnittdicke zu gross gewählt, ist im Fibrinfilm eine Lyse vorzufinden, deren Ausmass und Verteilung zu falschen Schlüssen bezüglich Quantität und Lokalisation des Plasminogenaktivators führt. Durch Überlagerung der Aktivatorwirkungen könnte auch hier starke Lyse vorgetäuscht werden. Andererseits hat der Aktivator eines fibrinolytisch aktiven Gewebebezirks die ganze Dicke des Schnittes zu durchdringen, um das Plasminogen des Films zu aktivieren. Diese Beeinträchtigung der Aktivator-Diffusion führt möglicherweise dazu, dass aktivatorreiche Abschnitte keine oder nur schwache Andauung auslösen. Für die topische und semiquantitative Auswertung der Lysehöfe ist folglich eine geringe und konstante Schnittdicke erforderlich (34).

Wir sehen, dass die Technik der Fibrinolyseautographie von einer

Anzahl rein technischer Parameter in einem viel stärkeren Masse abhängig ist, als andere histochemische Methoden, die mit standardisierten Bedingungen arbeiten. Bei der Methode nach Todd lassen sich die Bedingungen insofern nicht standardisieren, als man an die Intaktheit des ganzen Systems gebunden ist. So muss einmal der Fibrin-film, wie auch der Gewebeverband als Gesamtheit benutzt werden.

f) Überlebensgrad des Gewebes und Membranzustand

Für die Verarbeitung wird frisches Gewebe unmittelbar nach der Entnahme eingefroren. Zerstörung der Zellmembranen und somit Liberierung des Aktivators erfolgt dann erst beim Wiederauftauen des Kryostat-Schnitts. Zu diesem Zeitpunkt ist das Präparat bereits mit Fibrin-film bedeckt. Die Andauung des Fibrins durch Plasmin findet ortsrichtig und entsprechend der autochthonen Konzentration an Aktivator statt. Es ist anzunehmen, dass frisches Gewebe schärfere Lysezonen mit der Möglichkeit genauer Aktivatorlokalisation liefert, als ein längere Zeit überlebendes Material, bei dem Verwischungen auftreten.

Auf Grund autolytischer und nekrobiotischer Vorgänge vor der Gewebsverarbeitung diffundieren möglicherweise vorzeitig liberierte Aktivatoren in angrenzende - ursprünglich aktivatorfreie oder aktivatorarme - Gewebsbezirke und verursachen so die beobachteten Verwischungen. Daraus resultieren unscharfe Lysezonen und diffuse fibrinolytische Aktivität.

Vielleicht ist die Verwendung solchen Materials auch der Grund, dass mehrere Autoren (45, 57, 81, 93, 94) zu der Ansicht gekommen sind, im Endometrium bestehe eine mehr diffuse Aktivität. Nach der von uns praktizierten Methode ist die fibrinolytische Aktivität in keinem der untersuchten Gewebe als diffus zu bezeichnen. Plasminogenaktivatoren konnten immer exakt lokalisiert werden.

Aus diesem Grund meinen wir, dass die von uns modifizierte Technik der Fibrinolyseautographie mit Verarbeitung von lebensfrischem Gewebe überlegen ist

- den Extraktionsmethoden nach Albrechtsen und Astrup (13),

da hierbei sehr unterschiedliche Gewebsqualitäten in einen Topf geworfen werden;

- auch den Arbeitsweisen, die die Todd'sche Methode anwenden und diffuse fibrinolytische Aktivität erhalten.

Nach unseren Beobachtungen darf angenommen werden, dass dabei "fauliges Gewebe" verwendet wurde; Gewebe, über das bereits erhebliche nekrobiotische Vorgänge hinweggegangen sind, die dann zu diffusen Membranstörungen geführt haben.

g) Stase im Gewebe

Aus tierexperimentellen Untersuchungen (55, 56) geht hervor, dass Gewebe auf akute Sauerstoffmangelsituation mit einer Aktivierung des fibrinolytischen Potentials reagiert. Ischämie oder Stase führen so offenbar zur Freisetzung von Aktivator aus der Gefäßwand oder aus der unmittelbaren Gefäßumgebung (30, 36, 43, 55, 67).

Während der Gewebsentnahme intra operationem kommt es durch Abklemmen der Blutgefäße zur Stase. Diese löst im gewonnenen Präparat Liberierungsvorgänge aus, die eigentlich erst durch die Nekrobiose im Schnitt in Gang gesetzt werden sollten. Die Zeitdauer der Stase stellt deshalb einen wesentlichen Faktor für die vorzeitige Aktivatorfreisetzung dar. Übernimmt man also Gewebe nach längerer Stauung, so sind wahrscheinlich bereits Aktivatoren des Plasminogens für den Nachweis verloren gegangen.

Trotz dieser Beobachtungen können wir sagen, dass die mit der Todd'schen Technik erzielte Lyse im wesentlichen doch abhängig ist von der autochthonen Aktivatorkonzentration, die a priori im Gewebe besteht.

Das beweisen die Bilder mit fibrinolytischer Aktivität der Funktionalis und des Myometriums bei fibrinolytisch stummer Basalis (s. Abb. 12, 13, 14). Das beweisen auch die Bilder vom Adeno-Karzinom, das zwar durchblutet ist und viel Gefäße aufweist, aber eben nicht fibrinolytisch aktiv ist, weil offensichtlich das Gewebe keinen Aktivator besitzt, oder ihn bereits verbraucht hat (s. Abb. 21, 22, 23).

In diesem Zusammenhang ist auch die Frage nach weiteren Ursachen der beobachteten Aktivatorschwankungen zu stellen.

Der Uterus ist ein besonders reiches Organ an Aktivatoren der Fibrinolyse, und wir wissen, dass seine Gewebsschnitte unterschiedlichen Aktivatorgehalt besitzen. Wir wissen auch, dass eine enge Beziehung zwischen der Vaskularisation eines Gewebes und seiner fibrinolytischen Aktivität besteht (45, 46, 81, 92, 93). Die fibrinolytische Aktivität der Endometriumsgefäße ist zyklusabhängig (3), und, im Gegensatz zu der des Myometriums, durch Gestagene zu beeinflussen (45, 74, 81). Während sich also die Aktivität des Myometriums nur gering ändert (3, 45), macht das Endometrium Aktivitätsschwankungen durch, die der vaskulären Proliferation parallel laufen (3, 45, 46, 93). Allerdings ist die Vaskularisation allein kein Anzeichen für das Vorhandensein von Plasminogen-Aktivatoren, da es stark durchblutete Organe und Gewebe gibt, die inaktiv sind, wie z. B. Leber (1, 28, 84, 86), Nierenrinde (62) und decidual umgewandeltes Endometrium (3, 42, 57, 74).

TABELLE 2

Störfaktoren bei der Fibrinolyseautographie nach Todd

- im Film:
 - Fibrinolyse an Fremdsubstrat
 - Plasminogengehalt
 - Plasminogenkonzentration
 - Diskontinuität der Plasminogenverteilung
 - plasmatische Inhibitoren des Rinderfibrinogens
 - Schwankungen im pH-Wert
 - ausgehend vom Gewebe:
 - Gewebeinhibitoren
 - nicht kontinuierliche Schnittdicke
 - nekrobiotisches Gewebe mit Membranstörungen
 - intraoperative Stase
 - Aktivatorschwankungen
 - extrazelluläre Eiskristallbildung beim Einfrieren
- } vorzeitige Liberierung des Aktivators

Davon ausgehend, dass alles kanalikuläre Gewebe a priori Aktivator besitzt, glauben wir, dass gerade an der Decidua ein Prozess abläuft, der offenbar mit dem Verbrauch oder der Verdünnung von Aktivator einhergeht. Dabei kann man Parallelen finden zur Fibrinierung in diesem Gewebe: je stärker die Fibrinierung, desto geringer ist der Gehalt an Aktivator (56a).

Die Inaktivität der Decidua lässt sich also auf eine Massenzunahme an Gewebebestandteilen zurückführen, die autochthon keinen Aktivator enthalten (56a). Andererseits wäre zu diskutieren, ob nicht die Änderung des Polymerisationsgrades in den sauren Mucopolysacchariden, die in der Decidua eine starke Zunahme erfahren, Aktivator mehr oder weniger fest bindet, so dass er nicht mehr liberiert werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

Die modifizierte Methode der Fibrinolyseautographie stellt eine elegante Technik zum Nachweis der Plasminogenaktivatoren im Gewebe dar. Sie ist auf Grund der erzielten Lysehöfe über aktivatorreichen Gewebsbezirken praktikabel, obgleich sie einer Vielzahl störender Faktoren (1) unterliegt (Tab. 2), welche die Resultate beeinträchtigen können. So kommen wir zu dem Schluss, dass die Ergebnisse dieser Methode eben doch ein Summationseffekt sind, ein Summationseffekt, dessen hervorstechendes Merkmal die Fibrinolyse ist, aber nur ein hervorstechendes Merkmal.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Fibrinolyseautographie nach A.S. Todd die fibrinolytische Aktivität verschiedener pathologischer und nicht pathologischer Uterusgewebe des Menschen untersucht. Diese Methode ermöglicht es, die Histologie des Gewebeschnittes mit dem Auftreten und der Lokalisation der Plasminogenaktivatoren zu vergleichen.

Die Originalmethode erbrachte keine annehmbaren Resultate. So musste im Laufe der Untersuchungen eine Modifikation entwickelt werden, die, unter Verwendung von Gewebe, das unmittelbar nach der Entnahme verarbeitet wurde, und mit der Aktivität des Gewebes angepassten Inkubationszeiten, eine reproduzierbare Methode und zufriedenstellende Ergebnisse lieferte.

Dabei ergab sich:

- Im menschlichen Uterusgewebe gelingt der Nachweis von Plasminogenaktivatoren, die um Gefäße des Myo- und Endometriums lokalisiert sind.
- Im Endometrium kann, abweichend von Befunden anderer Autoren, keine diffuse Aktivität festgestellt werden.
- Basalis und endometriale Drüsen sind fibrinolytisch inaktiv.
- Am Endometriumblastom ist keine fibrinolytische Aktivität nachzuweisen, da es keine autochthonen Plasminogenaktivatoren besitzt, oder sie verbraucht hat.
- Bei Verwendung plasminogenfreien Fibrins (hitzebehandelt) zur Bestimmung unspezifischer proteolytischer Enzyme ist keine Andauung zu beobachten.

Diese Befunde werden durch die von den Autographen im Photomikroskop angefertigten Ablichtungen belegt.

Trotz der vorgenommenen Abänderungen unterliegt die Fibrinolyseautographie einer Vielzahl von Störfaktoren und wird von rein technischen Pa-

rametern mehr oder weniger stark beeinflusst:

- Beim Einfrieren des Gewebes zur Konservierung muss mit teilweiser Inaktivierung des Aktivators und Strukturveränderungen des Gewebes durch extrazelluläre Eiskristallbildung gerechnet werden.
- Intraoperative Stase sowie nekrobiotische Vorgänge vor der Gewebsverarbeitung setzen vorzeitig Aktivator frei.
- Eine nicht kontinuierliche Schnittdicke des Gewebes kann - da sie über die Konzentration des Aktivators entscheidet - ebenso wie ungleichmässige Verteilung des Plasminogens im Film, starke bzw. geringe Lyse vortäuschen.
- Auch pH-Abhängigkeiten können, wie bei jedem enzymologischen Prozess, für das Ausmass der enzymatischen Aktivität bestimmend sein.
- Unter Einwirkung plasmatischer und geweblicher Inhibitoren entspricht das im Fibrinolyseautograph gemessene fibrinolytische Potential nur noch der Resultante aus Aktivierung und Inhibierung und nicht mehr der autochthonen Aktivatorkonzentration, die a priori im Gewebe besteht.

Die Ergebnisse der Fibrinolyseautographie sind nur als Summationseffekt anzusehen, deren hervorstechendes Merkmal die Fibrinolyse ist.

F. LITERATUR-VERZEICHNIS

- (1) ABE, T., NAKASHIO, K., KAZAMA, M.: Localization of fibrinolytic activity in vessel wall and its correlation with the blood coagulation system. 3rd. International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, New York, 1968, p. 2.
- (2) ACCINELLI, G.: Fibrinolytic activity of human lochia. Arch. obstet. ginec. 70 : 294 (1966).
- (3) ALBRECHTSEN, O. K.: The fibrinolytic activity of the human endometrium. Acta endocrin. 23 : 207 (1956).
- (4) ALBRECHTSEN, O. K.: The fibrinolytic activity of menstrual blood. Acta endocrin. 23 : 219 (1956).
- (5) ALBRECHTSEN, O. K.: The fibrinolytic activity of human tissues. Brit. J. Haemat. 3 : 284 (1957).
- (6) ALL, S. Y., LACK, C. H.: Studies on the tissue activator of plasminogen. Distribution of activator and proteolytic activity in the subcellular fractions of rabbit kidney. Biochem. J. 96 : 63 (1965)
- (7) ALKJAERSIG, N., FLETCHER, A. P., SHERRY, P.: Epsilon-amino-caproic acid: an inhibitor of plasminogen activation. J. biol. chem. 234 : 832 (1959).
- (7a) AMBRUS, J. L., zitiert bei Haberland, G. L.: Einleitende Bemerkungen zu den Grundlagen der Trasylol-Therapie, in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie 2, Symposium in Bad Godesberg u. München 1967, S. 5, Schattauer 1968.
- (8) ASTRUP, T., PERMIN, P. M.: Fibrinolysis in the animal organism. Nature 159 : 681 (1947).
- (9) ASTRUP, T., STAGE, A.: Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. Nature 190 : 929 (1952).
- (10) ASTRUP, T.: The biological significance of fibrinolysis. Lancet 2 : 565 (1956).
- (11) ASTRUP, T.: Fibrinolysis in the organism. Blood 11 : 781 (1956).
- (12) ASTRUP, T., STERNDOERFF, J.: Fibrinolysokinase activity in animal and human tissue. Acta physiol. scand. 37 : 41 (1956).

- (13) ASTRUP, T., ALBRECHTSEN, O. K.: Estimation of the plasminogen activator and the trypsin inhibitor in animal and human tissues. Scand. J. clin. Lab. Invest. 9 : 233 (1957).
- (14) ASTRUP, T.: Blutgerinnung, Fibrinolyse und Wundheilung. Die Medizinische 1972 (1959).
- (15) ASTRUP, T., BELLER, F. K.: Fibrinolytic activity of human uterine tube. Obstet. Gynec. Vol. 25 : 853 (1965).
- (16) ASTRUP, T., KWAAN, H.: Zit. nach Vortrag Astrup, T.: Biochemie des Plasmins. 9. Tgg. Dtsch. Arb. Gem. Blutgerinnungs-Forschung. Freiburg 1965. Suppl. Thromb. Diath. haemorrh., Schattauer, Stgt.
- (17) ASTRUP, T.: Tissue activators of plasminogen. Fed. Proc. 25 : 42 (1966).
- (18) BACK, N., SHIELDS, R., de WITT, G., AMBRUS, C. M.: Uptake of fibrinogen and fibrinolytic enzymes by neoplastic tissue. J. Nat. Cancer Instit. Vol. 36, No. 2, p. 171 (1966).
- (18a) BECK, E., SCHMUTZLER, R., DUCKERT, F.: Inhibition of fibrinolysis and fibrinogenolysis in man. Comparison of EACA and Kallikrein Inhibitor. Thromb. Diath. haemorrh. 10 : 106 (1963)
- (19) BELLER, F. K., GRAF, H.: Gerinnungsphysiologische und Plasmaeiweissuntersuchungen bei normalen und pathologischen uterinen Blutungen. Arch. Gynäk. 188 : 441 (1957).
- (20) BÖVING, B. G.: Eindringen des Trophoblasten in das Uterusepithel. Klin. Wschr. 42 : 467 (1964).
- (21) CLIFFTON, E.: J. Appl. Physiol. 26 : 559 (1945).
- (22) CLIFFTON, E., GROSSI, C.: Fibrinolytic activity of human tumors as measured by the fibrinplate method. Cancer 8 : 1145 (1955).
- (23) DEANE, H. W., BARNETT, R. J., SELIGMAN, A. M.: Enzyme. In: Handbuch der Histochemie. Bd. VII/1, S. 3, Fischer Stgt., 1960.
- (24) DEMUTH, F., RIESEN, J. von: Biochem. Z. 203 : 22 (1928).
- (25) DIEZEL, P. B.: Über die Brauchbarkeit des Kryostaten in Histologie und Histochemie. Mikroskopie Bd. 13 : 196 (1958).
- (25a) ELEERT, R., NOLD, B.: Gerinnungsphysiologische Studien am Menstrualblut. Schweiz. med. Wschr. 86 : 999 (1956).

- (26) ESPOSITO, A.: Fibrinolytic activity of the human endometrium at term. Clin. obstet. gynec. 67 : 126 (1965).
- (27) FEARNLEY, G. R.: Fibrinolysis. Second fibrinolysis workshop. J. clin. Path. 17 : 305 (1964).
- (28) FEARNLEY, G. R.: Fibrinolysis. Arnold Ltd., London 1965.
- (29) FLEISHER, M. S., LOEB, L.: J. biol. chem. 21 : 477 (1915).
- (30) FLEISCHHACKER, H., STACHER, A.: Bedeutung der Fibrinolyse für die Klinik. Med. Klinik 57 : 703 (1962).
- (31) FONIO, A.: Neue Untersuchungen über die physiol. fibrinolytischen Vorgänge in vitro. Schweiz. Med. Wschr. 44 : 1243 (1960).
- (32) FUHRMANN, K.: Hormone und Fermente des Endometriums. Gynaecologia 152 : 1 (1961).
- (33) FUHRMANN, K.: Untersuchungen über die fibrinolytische Aktivität des Endometriums. Zbl. Gynäk. 84 : 1457 (1962).
- (34) GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoff-Methode. Histochemie Bd. I : 48 (1958).
- (35) HARBERS, E.: Autoradiographie als histochemisches Untersuchungsverfahren. In: Handbuch der Histochemie Bd. I/1, S. 421, Fischer Stgt., 1958.
- (36) HOLEMANS, R.: Site of origin of increased fibrinolytic activity during venous occlusion. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118 : 488 (1965).
- (37) JANDA, R.: Fibrinolytic activity of the tunica intima of large arteries in atheromatosis. Folia Histochem. and Cytochem. (Krakow) 3 : 267 (1965).
- (38) KALLER, H.: Pharmakologie des Trasylols. In: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie 2, Sympos. in Bad Godesberg u. München 1967, S. 11, Schattauer, Stgt. 1968.
- (39) KAPPERT, A.: Experimentelle und klinische Untersuchungen über Thrombogenese und Fibrinolyse. Benno Schwabe (Basel - Stgt.) 1962.
- (40) KLINE, D. L.: Chemistry and biochemistry of the fibrinolytic system. Fed. Proc. 25 : 31 (1966).

- (41) KOLLER, F.: Fibrinolyse. Schweiz. Med. Wschr. 91 : 1233 (1960).
- (42) KULLANDER, S., KALLER, B.: The fibrinolytic activity of human endometrium, studied in tissue culture. I. Normal endometrial and decidual tissue. Acta obstet. gynec. scand. 40 : 1 (1961).
- (43) KWAAN, H. C., ASTRUP, T.: Localization of fibrinolytic activity in myocardial infarcts in rats. Thromb. Diath. haemorrh. 12 : 407 (1964).
- (44) KWAAN, H. C., ASTRUP, T.: Fibrinolytic activity of reparative connective tissue. J. Path. Bact. 87 : 409 (1964).
- (45) KWAAN, H. C., ALBRECHTSEN, C. K.: Histochemical study of fibrinolytic activity in the rat uterus in normal and hormonally induced estrus. Amer. J. Obstet. Gynec. 95 : 468 (1966).
- (46) KWAAN, H. C.: Tissue fibrinolytic activity studied by a histochemical method. Fed. Proc. 25 : 52 (1966).
- (47) LACK, C. H.: Brit. med. Bull. 20 : 217 (1964).
- (48) LAMBERT, R. A., HANES, F. M.: J. exp. Med. 13 : 1945 (1911).
- (49) LASSEN, M.: Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method. Acta physiol. scand. 27 : 371 (1952).
- (50) LEWIS, J. H., FERGUSON, J. H.: Fibrinolysokinase activators for profibrinolysin. J. clin. Invest. 29 : 1059 (1950).
- (51) LILLIE, R. D.: In: Histopathologic technic and practical histochemistry. 3rd. ed. McGraw - Hill Company 1965.
- (52) LOO, J. van de, GROSS, R.: Blutgerinnung und Fibrinolyse. Anleitung zur Therapie mit Anticoagulantien, Thrombolytika und Inhibitoren der Fibrinolyse. 2. Aufl. 1969, Köln.
- (52a) LUDWIG, H.: Zur Pathogenese, Diagnose und Therapie des akuten hämorrhagischen Syndroms in der Geburtshilfe. Fortschr. Med. 82 : 717 (1964).
- (53) LUDWIG, H., MEHRING, W.: Zur Behandlung uteriner Blutungen mit Epsilon-Aminocaprinsäure. Fortschr. Med. 83 : 585 (1965).
- (54) LUDWIG, H.: Uterine Blutungen bei hämorrhagischen Diathesen. Münch. med. Wschr. 109, 1 : 46 (1967).

- (55) LUDWIG, H.: Zur Anwendung von Trasylol in Geburtshilfe und Gynäkologie. In: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie 2, Sympos. in Bad Godesberg und München 1967, S. 115, Schattauer, Stgt. 1968.
- (56) LUDWIG, H.: Mikrozirkulationsstörungen und Diapedeseblutungen im fetalen Gehirn bei Hypoxie. Bibl. Gynaecol. Nr. 46, S. 1, (1968), oder Karger, Basel 1968.
- (56a) LUDWIG, H.: Persönliche Mitteilungen.
- (57) LUGINBUHL, W. H., PICOFF, R. G.: The localization and characteristics of endometrial fibrinolysis. Amer. J. Obstet. Gynec. 95 : 462 (1966).
- (58) MARX, R., CLEMENTE, P., WERLE, E., APPEL, W.: Über die Wirkung von Proteinaseinhibitor - Präparaten auf die extravasale Fibrinolyse, Fibrinogenolyse und Blutgerinnungskonstanten im Menschenblut. Blut 9 : 164 (1963).
- (59) MARX, R.: Wirkungsweise der Fibrinolytika und Antifibrinolytika. Thromb. Diath. haemorrh. Suppl. 3 ad Vol. 7 : 27 (1963).
- (60) MAYERSBACH, H. von: Immunhistologische Methoden in der Histochemie. In: Handbuch der Histochemie I/2, S. 238, Fischer, Stgt. 1966.
- (61) McCALL, D. C., KLINE, D. L.: Mechanism of action and some properties of a tissue activator of plasminogen. Thromb. Diath. haemorrh. 14 : 116 (1965).
- (62) McCONNEL, D., JOHNSON, J., YOUNG, J., HOLEMANS, R.: Localization of plasminogen activator in kidney tissue. Lab. Invest. 15 : 980 (1966).
- (63) MERYMAN, H. T.: Mechanics of freezing in living cells and tissues. Science 124 : 515 (1956).
- (64) NEUMANN, K. H.: Anwendung der Gefriertrocknung für histochemische Untersuchungen. In: Handbuch der Histochemie I/1, Fischer, Stgt. 1958, S. 4 - 12, 17 - 24, 31 - 35, 59 - 61.
- (65) NEUMANN, K. H.: Grundriss d. Gefriertrocknung. Musterschmidt, Göttingen 1952.

- (66) NEUMANN, K. H.: Gefriertrocknung und ihre Leistungen für die Konservierung von Organpräparaten. In Kuhn: Zellulärtherapie in Klinik und Praxis. Hippokrates, Stuttg. 1956, S.39.
- (67) NILSSON, I. M., BJÖRKMAN, S. E., ANDERSON, L.: Clinical experiences with EACA as an antifibrinolytic agent. Acta med. scand. 170 : 487 (1961)
- (68) NILSSON, I. M., BJÖRKMAN, S. E.: Experiences with Epsilon-amino-caproic acid in the treatment of profuse menstruation. Acta med. scand. Vol. 177 : 445 (1965).
- (69) O'MEARA, R. A.: Coagulative properties of cancers. Irish J. Med. Sci. 394 : 474 (1958).
- (70) O'MEARA, R. A.: The growth-pattern of carcinomas. Arch. De Vecchi Anat. Pat. 31 : 365 (1960).
- (71) PAGE, E. W., GLENDENING, M. B., PARKINSON, M. D.: Cyclic biochemical changes in the human endometrium. With special reference to the fibrinolytic enzyme. Americ. J. Obstet. Gynec. 62 : 1100 (1951)
- (72) PEARSE, A. G. E.: Histochemistry, Theoretical and Applied 2nd. ed., London; Churchill (1960).
- (73) PERMIN, P. M.: Nature, Lond. 160 : 571 (1947).
- (74) PHILIPS, L. L., BUTLER, B. C., TAYLOR, H. C.: A study of cyto-fibrinokinase and fibrinolysin in extracts of tissue from human myometrium, endometrium, decidua and placenta. Amer.J. Obstet. Gynec. 71 : 342 (1956).
- (75) PROKOPOWIECZ, J., REJNIAK, L.: Fibrinolytic activity of tissue sections of the dog kidney. Thromb. Diath. haemorrh. 12 : 396 (1964).
- (76) RIECKEN, E., GOEBELL, H., BODE, C.: The influence of low temperature and storage time on some histochemically demonstrable enzyme activities in liver, kidney and jejunum of the rat. 3rd. Intern. Congr. Histochem. and Cytochem., New York 1968, p. 218.
- (77) ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. Oldenburg-Verlag, München 1968.

- (78) RYBO, G.: Plasminogen activators in the endometrium. I. Methodological aspects. Acta obstet. gynec. scand. 45 : 411, 1966.
- (79) SCHLEMMER, H.: Stabilisierung des fibrinolytischen Systems mit einem Fibrinolyseinhibitor. Experimentelle Untersuchungen an trächtigen Kaninchen. Inaug. Diss. (München 1968).
- (80) SCHMIDT-MATTHIESEN, H.: Uterus myomatosus als Aktivierungsherd einer chronischen, generalisierten Fibrinolyse. Geburts. Frauenheilk. 26 : 1158 (1966).
- (81) SCHMIDT-MATTHIESEN, H.: Die fibrinolytische Aktivität von Endometrium und Myometrium, Dezidua und Plazenta, Kollum- und Korpuskarzinomen. Bibl. Gynäk. Nr. 44 (1967), oder Karger, Basel 1967.
- (82) SCHMUTZLER, R.: Methodik der Differenzierung hyperfibrinolytischer Zustände und antifibrinolytischer Wirkungen. In: Neue Aspekte der Thrombolysen-Therapie I, Sympos. in Grosse Ledder 1965, S. 20, Schattauer, Stgt. 1966.
- (83) SCHULER, R.: Enzym. Carcinomdiagnostik und Fibrinolyse. D.ärtl. Labor. 4 : 281 (1958).
- (84) SCOTT, G. B. D., BLASZCZYNSKI: Tissue activator of plasminogen. Arch. Path., Vol. 80 : 70 (1965).
- (85) SKJØDT, P., ALBRECHTSEN, O. K.: Coagulation and fibrinolysis in uterine blood. Acta obstet. gynec. scand. 44 : 416 (1965).
- (86) STAMM, H.: Einführung in die Klinik der Fibrinolyse. Karger, Basel 1962.
- (87) SUGIYAMA, Y.: Plasminogen activator in the cytoplasmic granules from different organs of mammals: Studies on intracellular localization, releasing and molecular size of two kinds of activators. Kobe J. Med. Sci. 11 : 151 (1965).
- (88) TAGNON, H. J., PALADE, G. E.: Activation of proplasmin by a factor from mammalian tissue. J. Clin. Invest. 29 : 317 (1950).
- (89) THIES, H. A.: Möglichkeiten der Fibrinolyse. Langenbeck Arch. Chir. 313 : 33 (1965).
- (90) TODD, A. S.: Fibrinolysis Autographs. Nature, London 181 : 495 (1958)

- (91) TODD, A. S.: Histological localization of fibrinolysin activator. J. Path. Bact. 78 : 281 (1959).
- (92) TODD, A. S.: The tissue activator of plasminogen and thrombosis. Proceedings of a symposium: Thrombosis and Anticoagulant Therapie. Dundee, p. 25 (1960).
- (93) TODD, A. S.: Localization of fibrinolytic activity in tissues. Brit. med. Bull. Vol. 20 : 210 (1964).
- (94) TODD, A. S.: Some topographical observations on fibrinolysis. J. clin. Path. 17 : 324 (1964).
- (95) TODD, A. S.: Fibrinolytic activity in tissues and thrombi. First Intern. Symp. on tissue factors in the homeostasis of the coagulation-fibrinolysis system. Firenze, Maggio 1967.
- (96) USCYNSKI: Contents of the fibrinolysis activator in the nonpregnant uterus and in labor. Ginek. Polska 36 : 315 (1965).
- (97) VOGEL, P.: Die lokale und generalisierte Fibrinolyse beim Uteruskarzinom und ihre Beziehung zum Gewebsbild und zu klinischen Besonderheiten. Inaug. Diss. (Göttingen 1966).
- (98) ZUCKSCHWERDT, L.: Symposium über experimentelle und therapeutische Fibrinolyse. Schattauer, Stgt. 1963.
- (99) ZIMMER, F.: Wachstum der Uterusmuskulatur in der Schwangerschaft und seine Stimulation. Habilitationsschrift, München 1962.

Herrn Privatdozent Dr. med. Hans Ludwig
danke ich für die Überlassung des Themas
und das fördernde Interesse, das er vor-
liegender Arbeit entgegenbrachte.

Herrn Professor Dr. med. J. Zander, dem
Direktor der I. Universitäts-Frauenkli-
nik, bin ich für die Übernahme des Kor-
referats zu Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Am 29. Dezember 1941 wurde ich in Stuttgart als zweiter Sohn des Kaufmanns Erich Lepiorz und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Wenzler, geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule sowie der ersten vier Oberschulklassen in Esslingen, wechselte ich auf das Wirttemberg-Gymnasium in Stuttgart-Untertürkheim über, wo ich 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Während des gesamten Studiums, das ich im Frühjahr 1969 beendete, war ich an der Medizinischen Fakultät der Universität München immatrikuliert.

Anschliessend habe ich als Medizinalassistent an der Privat-Frauenklinik Bogenhausen in München, an den Städtischen Krankenanstalten Esslingen und im Katharinenhospital der Stadt Stuttgart gearbeitet.

